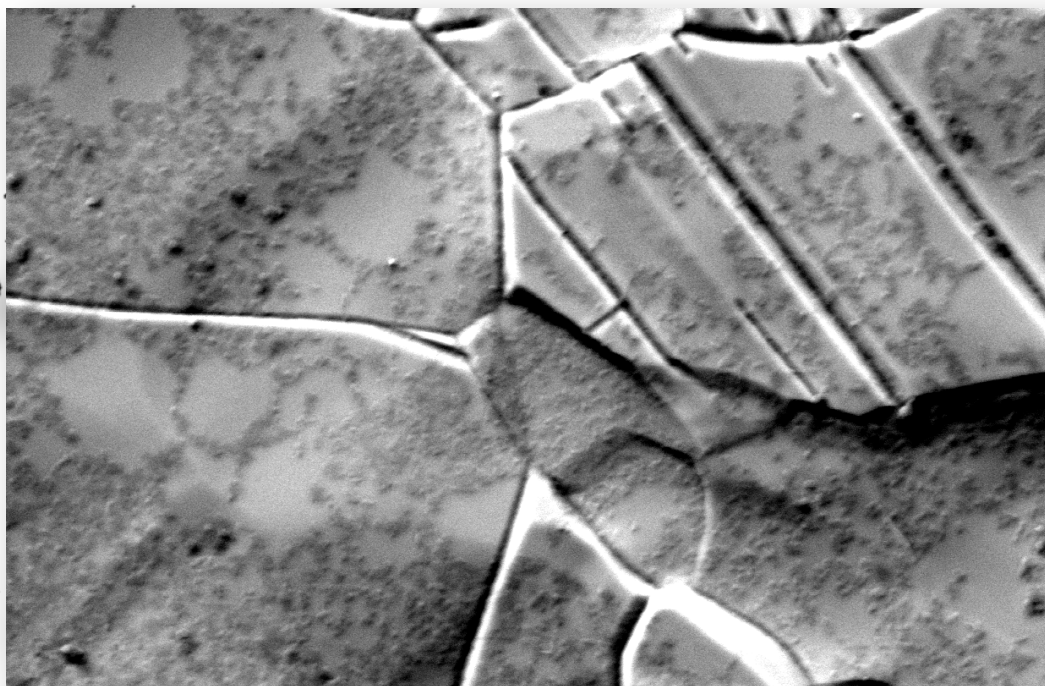


# ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES IMPLANTARES



Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em  
Cirurgia Oral apresentada à Faculdade de Medicina  
Dentária da Universidade do Porto

Carlos Hernandez Pintado

Porto, 2013





«ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES»

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Cirurgia Oral  
apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do  
Porto.

Carlos Hernandez Pintado

Porto, 2013



« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

Carlos Hernandez Pintado

**ORIENTADORES**

.....  
**Orientador:** Paula Cristina dos Santos Vaz Fernandes

Professora Auxiliar de Genética Médica e Orofacial  
da FMDUP

**Co-Orientador:** António Cabral de Campos Felino

Professor Catedrático de Cirurgia Oral da FMDUP



### **Membros do Conselho Científico**

#### **da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira (Prof. Catedrático) -  
Presidente

Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso (Prof. Associado  
c/agregação)

Prof. Doutor António Cabral Campos Felino (Prof. Catedrático) – Vice-  
Presidente

Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva (Prof. Associado  
c/agregação)

Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha (Prof. Associado)

Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz (Prof. Associado)

Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes (Prof.  
Catedrático)

Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho (Prof. Associado  
c/agregação)

Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas (Prof. Associado  
c/agregação)

Prof. Doutor José Carlos Reis Campos (Prof. Auxiliar c/ agregação)

Prof. Doutor José Mário Castro Rocha (Prof. Auxiliar)

Prof. Douto Manuel José Fontes de Carvalho (Prof. Associado)

Prof. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann (Prof.  
Associado)

Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva (Prof.  
Associada c/agregação)

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz (Prof. Associado - personalidade convidada)

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo (Prof. Associado c/agregação)

Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida (Professor Associado c/agregação)

### **Docentes Jubilados**

#### **da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira (Prof. Associado)

Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas (Prof. Associado - falecido)

Dr. António Ulisses Matos dos Santos (Assistente Convidado)

Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira (Prof. Associado c/Agregação)

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas (Prof. Catedrático)

Dr. José Maria Vaz Osório (Assistente Convidado)

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Manuel Desport Marques (Prof. Associado Convidado - falecido)

Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo (Prof. Associado)



*Aos meus queridos Pais*

*Ao meu único e querido irmão*

*À memória do meu Avô maternos*

*À minha família*

*Aos meus amigos*

*O agradecimento sempre será pouco...*

*Deixo-vos um pensamento...*

*“O futuro é construído pelas nossas decisões diárias, inconstantes e mutáveis, e cada evento influencia todos os outros.”*

*Alvin Toffler*

*A vós devo e dedico esta tese!*



Aos meus Mestres



Aos docentes da Faculdade de  
Medicina Dentária da  
Universidade do Porto





## **Agradecimentos**

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Cirurgia Oral na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica.

Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Ao Diretor da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Professor Doutor Afonso Pinhão Ferreira, agradeço o estímulo e motivação com que sempre me agraciou para evoluir na minha vida académica, constituindo um exemplo impar a seguir.

Ao Diretor de Curso de Mestrado em Cirurgia Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Professor Doutor João Fernando Costa Carvalho, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Vaz, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do Projeto.

Ao Professor Doutor António Cabral de Campos Felino, o meu sincero agradecimento pela co-orientação neste Projeto. Muito obrigado pela transmissão de profissionalismo, de rigor e de competência na investigação científica. Agradeço a sua co-orientação, apoio científico, os seus conselhos, as suas críticas e incentivo e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

Ao Professor Doutor Luís Rocha, Professor na Universidade Estadual Paulista (Faculdade de Ciências de Bauru, São Paulo - Brasil) e Investigador do Centre for Mechanical and Materials Technologies da Universidade do Minho, com quem tive o orgulho e privilégio de privar, agradeço todos os estímulos e desafios para a realização deste Projeto. Agradeço também pela amabilidade, amizade e boa disposição em todos os momentos. A sua sabedoria foi essencial para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

À Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa em particular à Professora Doutora Maria Manuela Estevez Pintado e aos membros do seu Grupo de Investigação, Mestre Eduardo Costa e Doutora Raquel Madureira, a quem agradeço todo o auxílio e apoio manifestados ao longo deste Projeto. Obrigada pelo apoio na execução dos estudos de microscopia e microbiológicos. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição.

Ao Prof. Doutor Fernando Oliveira pela amabilidade e cuidado na preparação das amostras necessárias para a elaboração deste Projeto.

Ao Professor Doutor Miguel Pinto agradeço todo o estímulo e motivação, que constituíram o motor da minha decisão de candidatura ao Mestrado em Cirurgia Oral da FMDUP. Parcas são as palavras que ainda posso proferir para agradecer ainda todo o conhecimento científico que me transmitiu ao longo de toda a minha curta vida académica.

Ao Professor Doutor Ricardo Faria e Almeida por ter sido tão importante na minha formação académica. É com muita admiração que lhe agradeço o estímulo sempre tão eficazmente provocador de crescimento pessoal.

Ao Professor Doutor Germano Rocha agradeço toda a transmissão de conhecimentos ao longo da minha vida académica. Não posso deixar de proferir ainda a minha gratidão pelos valores humanos, ética profissional e conhecimentos científicos com que sempre me agraciou.

Ao Professor Doutor Filipe Coimbra agradeço a transmissão de todos os conhecimentos científicos e rigor na prática clínica, que constituíram pilares na execução da minha tese.

Ao Professor Doutor Jorge Dias Lopes agradeço a motivação e estímulo para a realização desta tese de Mestrado.

Ao Professor Doutor Sampaio Fernandes agradeço a motivação e estímulo e as palavras dinamizadoras com que sempre me agraciou.

Ao Professora Doutora Helena Figueiral agradeço a constante motivação e espírito empreendedor, sempre presentes.

Ao Professor Doutor Reis Campos agradeço o auxílio e disponibilização para viabilização de alguns meios técnicos para a elaboração desta tese.

À Professora Doutora Maria João Ponces, pela motivação, amizade e conselhos, sobretudo nos momentos de desânimo.

Ao Professor Doutor Mário Jorge Silva, agradeço a cooperação, enquanto diretor do Departamento de Destisteria Operatoria, para a disponibilização do equipamento HealOzone®.

À Professora Doutora Ana Cristina Braga por toda a ajuda e empenho constante, mesmo não podendo estar presente pessoalmente.

Aos Meus Colegas de Serviço, Luís, Fred, Inês, Sara e Bibiana um Muito Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, factores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

Ao Dr. João Paulo Dias pela motivação constante.

À D. Manuela Miranda, Sr. Vítor Moura e D. Alexandra Lopes pela amabilidade, colaboração, disponibilidade e competência no auxílio durante a frequência do Mestrado em Cirurgia Oral na FMDUP.

À Dra. Carla Pinto agradeço toda disponibilidade, amabilidade e competência sempre presentes, mesmo nos momentos de desanimo.

À D. Delfina Alves, os meus agradecimentos pela disponibilidade e competência inexcedíveis na recolha das referências bibliográficas.

Ao Sr. António Cunha, os meus agradecimentos pela disponibilidade e amizade.

Ao Sr. Manuel Taborda, agradeço a disponibilização do equipamento HealOzone ® para execução deste Projeto de investigação.

Aos Meus Amigos, em especial Paulo Osório pelos intermináveis desabaços ao telemóvel e pela partilha dos bons (e menos bons) momentos.

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, ao Meu Irmão, aos meus Tios e Tias e aos Meus Avós, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Aos alunos e funcionários da FMDUP.

Aos meus colegas e aos meus amigos.





## CONTEÚDO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>O OZONO</b>	<b>26</b>
<b>O OZONO EM MEDICINA DENTÁRIA</b>	<b>32</b>
OZONO – APLICAÇÃO EM MEDICINA ORAL	33
OZONO – APLICAÇÃO EM CIRURGIA ORAL	33
OZONO – APLICAÇÃO EM PERIODONTOLOGIA	34
OZONO – APLICAÇÃO EM PROSTODONTIA	35
OZONO – APLICAÇÃO EM ENDODONTIA	35
OZONO – APLICAÇÃO EM DENTISTERIA	36
<b>IMPLANTES EM MEDICINA DENTÁRIA</b>	<b>38</b>
<b>BIOLOGIA DO PERIODONTO E PATOLOGIA PERIODONTAL</b>	<b>41</b>
<b>SAÚDE PERI-IMPLANTAR E PATOLOGIA PERIODONTAL</b>	<b>46</b>
<b>MICROBIOTA PERIODONTAL E PERI-IMPLANTAR</b>	<b>50</b>
<b>OBJETIVOS E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>59</b>
SELEÇÃO DA AMOSTRA	60
PREPARAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO	60
APLICAÇÃO DO OZONO	64
ANÁLISE DO EFEITO DO OZONO NO BIOFILME ORAL	70
TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
EFEITO DO GÁS OZONO NA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO	78
EFEITO DO GÁS OZONO NA CULTURA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	85
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>99</b>

<b>LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURAS</b>	<b>101</b>
<b>RESUMO</b>	<b>105</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>





# INTRODUÇÃO

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

## O OZONO

A palavra Ozono ( $O_3$ ) é derivada do termo grego "ozein", que significa "cheiro" ou "mau cheiro", em alusão ao seu odor característico (1). O Ozono é considerado um dos mais potentes agentes antimicrobianos, disponíveis para aplicação em medicina e medicina dentária (1). Em 1920, Edwin Parr, médico dentista Suíço, iniciou a aplicação do Ozono, como agente antimicrobiano, incluindo a sua utilização como parte integrante do seu sistema rotineiro de desinfecção (1). A aplicação do Ozono como terapia está atualmente instituída e difundida, tanto em medicina como em medicina dentária, como uma alternativa às terapias antimicrobianas convencionais e como terapêutica coadjuvante na maioria dos Países Europeus. Contudo, hodiernamente, a maioria da literatura internacional publicada sobre a fundamentação da aplicabilidade do Ozono, em medicina dentária, corresponde a estudos "*in vitro*", encontrando-se num número muito parco investigações que reportem "ensaios clínicos".

O gás de Ozono apresenta um potencial de oxidação elevado e é considerado como um forte agente antimicrobiano contra bactérias, vírus, fungos e protozoários. A este gás também lhe foi reconhecida a capacidade de estimulação da circulação do sangue e da resposta imune. Estas características *per si* já justificam o emergente interesse da sua aplicação em medicina e medicina dentária. Pelas referidas capacidades que possui, a utilização do Ozono foi preconizada em diversas áreas da medicina dentária, de que constituem exemplos: o tratamento de alveolite, onde poderá atuar como um substituto da terapia de antibiótico; a redução da população da microflora oral, atuando como um colutório; em procedimentos de periodontologia e implantologia, onde o modo de ação se centra na redução da



capacidade de adesão de microrganismos às superfícies dos dentes e implantes. Igualmente foi proposto que o Ozono possa ser utilizado na estimulação da remineralização dos dentes recentemente afetados por lesões de cárie (2).

Como acima referido, o Ozono foi considerado um agente com um elevado poder antimicrobiano já há alguns anos, atuando contra bactérias, fungos e vírus. No que concerne à atividade antibacteriana, o processo de ação do Ozono centra-se na atuação ao nível membrana celular da bactéria, através da promoção da oxidação dos lípidos e componentes lipoproteícos e interação com as proteínas membranares (3, 4).

Relativamente à ação do Ozono contra os fungos, acredita-se que o Ozono possui capacidade de tornar os esporos anormais durante a germinação, provavelmente através de danos provocados na membrana interna do esporo (5). Também foi descrita a capacidade de atuação do Ozono, a nível fúngico e de outros protozoários, exercendo-se a sua ação, através da inibição do crescimento celular em certas fases específicas destes microrganismos (1).

No que se refere ao efeito do Ozono sobre os vírus, a literatura é bastante consensual, reportando que todos os vírus são sensíveis ao Ozono, embora o grau de suscetibilidade de cada vírus ao Ozono seja muito variável (6). Assim, sobretudo os vírus "lipid-enveloped" são os que foram considerados dos mais sensíveis ao Ozono (7, 8). Quanto ao processo de atuação do Ozono sobre os vírus, o mesmo foi descrito através da ação de diversos mecanismos: danos nas cadeias de polipeptídeos dos vírus, danos nas proteínas que afetem a capacidade de ligação vírica e através da quebra do ácido ribonucleico (ARN) vírico (6).

No diz respeito aos efeitos produzidos pelo Ozono a nível de linhas celulares humanas, embora estes se encontrem descritos, os estudos

publicados são muito reduzidos (9). Um desses estudos analisou o efeito do Ozono nas células sanguíneas, tendo-se verificado que o mesmo reduzia ou eliminava a aglutinação dos glóbulos vermelhos do sangue. Contudo, apesar desta ação do Ozono nesta linha celular sanguínea, verificou-se ainda que a flexibilidade dos glóbulos vermelhos era rapidamente restaurada, juntamente com a capacidade de transporte de oxigénio (9). Seguindo esta linha de investigação, outros autores reportaram que neste processo de ação do Ozono sobre os glóbulos vermelhos ocorria uma estimulação da produção de glutathione peroxidase, de catalase, e da superóxido-dismutase; as quais atuavam como removedoras de radicais livres (10).

Quando ao efeito do Ozono sobre os leucócitos, verificou-se que o modo de ação do mesmo se baseava em adotar um comportamento similar ao de uma citocina relativamente fraca, tais como: o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-2, a interleucina-6, a interleucina-8 e o fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) indutor (11-14). Ainda sobre o efeito do Ozono sobre os leucócitos, um outro estudo reportou que o mesmo reagia com os ácidos gordos não saturados da camada lipídica das membranas celulares, formando-se o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o qual foi sobejamente considerado um dos indutores de citocinas mais importantes (15).

O potencial de aplicação de terapia de Ozono no corpo humano e os seus horizontes biológicos descritos são diversos, encontrando-se resumidos na tabela 1 (Tabela1).

---

**Tabela 1 - As aplicações potenciais da terapia de Ozono.**

---

**Antimicrobiana**

Danos na membrana citoplasmática  
Oxidação do conteúdo intracelular  
Atuação sobre estirpes antibiótico-resistentes

**Imunoestimulação**

Ativação celular e humoral do sistema imunitário  
Proliferação de células imunocompetentes  
Síntese de imunoglobulinas  
Aumento da atividade fagocitária  
Ativação de antioxidantes biológicos

**Analgésico, bioenergético e biosintético**

Ativação de síntese de proteínas  
Aumento do metabolismo celular (ribossomas e mitocôndrias)

---

*Fonte: Saini, R. 2011 (Adaptado e sem autorização do autor).*

---

O efeito antimicrobiano do Ozono é aquele que se encontra mais estudado na literatura internacional. No que concerne então à utilização da oxigénio-terapia por Ozono em medicina dentária, estão disponíveis uma multiplicidade de protocolos para lidar com a infeção e algumas recomendações à atentar na sua aplicação (16, 17). Encontram-se descritas três formas fundamentais de aplicação do Ozono nos tecidos orais: a água ozonizada, o óleo ozonizado, e a forma em oxigénio / gás de Ozono (17).

A aplicação do Ozono em medicina dentária, sob a forma de gás, pode ser efetuada através de equipamentos específicos de Ozono que convertem Oxigénio em Ozono (17). Nestes equipamentos, o Ozono após ser produzido, é posteriormente conduzido a uma peça de mão, equipada com um dispositivo, com o formato de um copo,

de silicone. Esses dispositivos de silicone estão disponíveis em diferentes formas, correspondentes à forma dos vários dentes humanos e às suas superfícies. Desta forma, pretende-se que se assegure um contato próximo entre o dispositivo de silicone e a área dentária a incidir, de modo a que o Ozono não escape e se mantenha o vácuo (17). Segundo protocolos da maioria dos fabricantes de equipamentos para medicina dentária, o Ozono deve ser conduzido através do dispositivo de silicone sobre o dente durante um mínimo de 10 segundos (seg.). Após este período, o Ozono presente no dispositivo de silicone será recolhido novamente e reconvertido ao Oxigénio pelos referidos equipamentos.

Quando se tratam de aplicações do Ozono em solução aquosa em medicina, os equipamentos foram concebidos no sentido de serem potenciadas sobretudo as seguintes propriedades do Ozono: desinfecção, esterilização, hemostase, aceleração do processo de cicatrização tecidular, promoção da oxigenação e do suporte de processos metabólicos aos tecidos (18).

Também se encontram descritas aplicações do Ozono sob a forma de óleo ozonizado. Este último é obtido por extração vegetal pura, através da qual o Oxigénio puro e Ozono, através de uma reação química, são passados ao estado de óleo (18). A aplicação do Ozono sob esta forma de óleo foi considerada um tipo de aplicação externa, completamente inofensiva (18).

Bocci e colaboradores (Bocci *et al.*, 1999) descreveram as vantagens da Ozono-terapia tópica em medicina. Segundo esta equipa de investigação existe sempre a possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana contra antibióticos, mas também existe a possibilidade de contrariar a ação destes agentes patogénicos, através da terapia com Ozono – os agentes patogénicos podem não ser capazes de superar os desafios oxidativos do Ozono (19). Para

além disso, o trabalho de investigação de Bocci e colaboradores demonstrou que o Ozono é capaz de inativar diretamente as toxinas bacterianas, ao contrário de alguns antibióticos, que não possuem esta propriedade (19).

Relativamente à biocompatibilidade do Ozono, o estudo de Huth e equipa (Huth *et al.*, 2006) foi inovador e pioneiro - investigou os efeitos citotóxicos do Ozono gasoso e aquoso em células epiteliais bucais humanas (BHY) e em fibroblastos gengivais (HGF-1). A avaliação dos efeitos celulares do Ozono foi efetuada por comparação entre grupos, com a adição de diferentes antissépticos: de digluconato de clorexidina (CHX) a 0,2%, de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25% e a 2,25% e de peróxido de hidrogénio a 3%. O Ozono aquoso foi aquele que revelou o nível mais elevado de biocompatibilidade, entre a globalidade dos antissépticos testados (20).

Num outro estudo levado a cabo com fibroblastos de modelo animal (rato), verificou-se que a atividade metabólica dos fibroblastos tornou-se muito elevada, quando estas células foram tratadas com água ozonizada, ao passo que a mesma diminuiu significativamente, quando as referidas células foram tratadas com hipoclorito de sódio a 2,5% (21).

No estudo realizado por Ebensberger e colaboradores (Ebensberger *et al.*, 2002), no qual procederam à irrigação da superfície da raiz de dentes obtidos por avulsão com água ozonizada e com uma solução salina (NaCl), não foi encontrado nenhum efeito negativo do Ozono sobre a proliferação das células do ligamento periodontal (22).

Uma outra investigação, realizada com células odontoblásticas de modelo animal, permitiu verificar que estas células odontoblásticas exibiam respostas inflamatórias contra lipopolissacáridos (LPS) bacterianos e que a água ozonizada melhorava a resposta inflamatória das mesmas células, quando induzida pelo LPS (23).

As aplicações do Ozono em medicina estão perfeitamente descritas e os seus efeitos clarificados. Nesse sentido, existem *consensus*, com recomendações e advertências descritas pela *European Cooperation of Medical Ozone Societies* sobre as aplicações do Ozono em medicina.

Assim, por exemplo, a *European Cooperation of Medical Ozone Societies* advertiu para que as injeções intravenosas diretas de Ozono / gás oxigénio não devam ser praticadas, devido ao possível risco de embolia aérea (2).

## **O OZONO EM MEDICINA DENTÁRIA**

A aplicação do Ozono em medicina dentária tem sido descrita e proposta em diversas áreas (Tabela 2), nomeadamente em Dentisteria Operatória (no tratamento de lesões de cárie), em endodontia (na desinfeção canalar), em medicina oral e também em cirurgia oral (no tratamento de infeções pós-extracionais, entre outras indicações) (17).

---

**Tabela 2 - Indicações da Ozono-terapia em medicina dentária.**

---

Remoção de biofilme (remoção de bactérias patogénicas)

Desinfeção das bolsas periodontais

Prevenção de lesões de cárie dentária

Tratamento endodôntico

Extração dentária

Sensibilidade dentária

Controlo da dor dentária

Controlo da infeção dentária

Aceleração do processo de cicatrização

Remineralização da superfície dentária

---

Fonte: Saini, R. 2011 (Adaptado e sem autorização do autor).

## **OZONO – APLICAÇÃO EM MEDICINA ORAL**

Relativamente à medicina oral em específico, tem sido estudado o tratamento de lesões de herpes através da administração tópica de Ozono (24, 25) e da aplicação de óleo ozonizado (15). Com a utilização de óleo ozonizado em lesões de herpes labial mandibular foram descritos períodos de cicatrização das referidas lesões muito mais reduzidos, quando comparados com as terapias convencionais do tratamento de lesões de herpes labial (15). Estes autores verificaram também que o tempo de cicatrização, em casos de tratamento de lesões de osteomielite com óleo ozonizado, foi mais célere do que o ocorrido com protocolos convencionais (2). A ação do Ozono nestes casos centra-se na neutralização do vírus herpes por ação direta, na inibição de supra-infeções bacterianas e na estimulação da cicatrização dos tecidos, através da promoção da revascularização (26). Para além destas ações diretas do Ozono nos tecidos, também as propriedades antioxidantes do Ozono tem sido referidas como uma das determinantes da sua aplicabilidade em medicina dentária (26).

## **OZONO – APLICAÇÃO EM CIRURGIA ORAL**

No que concerne às indicações do Ozono em cirurgia oral, este agente é conhecido pelas capacidades de estimulação de cicatrização de feridas operatórias e de controlo de infeções oportunistas (27). Foi demonstrado que o tratamento diário com água ozonizada acelera a taxa de cicatrização fisiológica (2). Neste estudo, realizado por Nogales *et al.* (2008), no qual se comparou a utilização de óleo ozonizada num grupo experimental e num grupo de controlo, em que a antibioterapia foi usada no tratamento de alveolite, verificou-se que os pacientes tratados com o óleo ozonizado obtiveram mais rapidamente a resolução da alveolite (2). A utilização

do Ozono também foi preconizada no tratamento das lesões de osteonecrose avascular da mandíbula (ONJ). De fato, os resultados indicaram uma cicatrização completa das lesões com o desaparecimento dos sintomas com a utilização do Ozono (28-31).

Embora em implantologia oral já tenha sido indicada a utilização de terapia com o Ozono, pelos fabricantes de dispositivos de aplicação de Ozono em medicina dentária, a literatura disponível sobre os efeitos do mesmo sobre as superfícies implantares e sobre os tecidos peri-implantares e respetiva flora ainda é parca (32-35).

## OZONO – APLICAÇÃO EM PERIODONTOLOGIA

A ação do Ozono em periodontologia baseia-se sobretudo na capacidade de redução da placa bacteriana e na ação bactericida (35, 36).

Assim, verificou-se que a água ozonizada inibiu a acumulação de placa bacteriana num estudo experimental *in vitro* de Nagayoshi M e colaboradores realizado em 2004 (36). De fato, nesta investigação, a água ozonizada evidenciou uma potente atividade bactericida contra as bactérias no biofilme da placa bacteriana. Senão note-se: a água ozonizada (0,5-4 mg/l) foi altamente eficaz na morte tanto de microrganismos Gram-positivos como de Gram-negativos; as bactérias Gram-negativas, tais como a *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* foram mais sensíveis à água ozonizada do que as bactérias gram-positivas como os estreptococos orais e *Candida albicans*, em cultura pura (36).

Um outro estudo concluiu que a adição do Ozono ao equipamento de destarização por ultrassons, comparado com a adição de diferentes soluções experimentais, resultou numa maior atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus* (37). Mais se acrescenta, que está devidamente documentado na literatura que a



água ozonizada possui uma excelente capacidade anti-inflamatória (20, 38, 39).

## OZONO – APLICAÇÃO EM PROSTODONTIA

Os estudos sobre a aplicação do Ozono em prostodontia tem-se centrado sobretudo na avaliação do efeito da água ozonizada sobre microrganismos orais presentes em próteses removíveis (36, 40). Um número muito reduzido de microrganismos orais foram detetados após a exposição de próteses removíveis ao fluxo de água ozonizada (2 ou 4 mg/l) durante 1 minuto (min), o que sugere que a aplicação da água ozonizada pode ser útil na redução do número de *Candida albicans* em bases de próteses dentárias (40). Um outro estudo, que comparou o efeito microbida entre o Ozono gasoso e a água ozonizada em próteses dentárias removíveis, demonstrou que a exposição direta ao Ozono gasoso foi mais eficaz, em termos de ação microbida (41).

## OZONO – APLICAÇÃO EM ENDODONTIA

O poder oxidativo do Ozono caracteriza-o como um eficiente agente antimicrobiano. Esta ação antimicrobiana foi demonstrada contra diversas estirpes bacterianas, tais como *Micobacteria* (38), *Streptococcus* (21), *Pseudomonas aeruginosa* (38, 42), *Escherichia coli* (38), *Staphylococcus aureus* (38, 43), *Peptostreptococcus* (42), *Enterococcus faecalis* (21, 42, 44, 45), e *Candida albicans* (40, 43, 45).

Já estão disponíveis alguns estudos *in vitro* que investigaram o efeito bactericida do Ozono em endodôntia, em comparação com o hipoclorito de sódio a 2,5% (a solução de irrigação padrão na endodontia). Contudo, os resultados destes estudos são ainda muito controversos (21, 44, 46, 47).

## OZONO – APLICAÇÃO EM DENTISTERIA

A aplicação da terapia com Ozono no quotidiano da medicina dentária tem vindo a sofrer um incremento nos últimos anos, sobretudo por constituir uma forma de tratamento atraumático, particularmente em procedimentos de dentisteria operatória. Alguns dos estudos *in vitro* avaliaram o efeito do Ozono na prevenção do desenvolvimento de lesões de cárie em fóssulas e fissuras (48) e na capacidade do Ozono impedir a evolução de lesões de cáries primárias (49-52). Apesar destes estudos apresentarem um reduzido *follow-up*, revelaram resultados importantes - evidenciaram reduções significativas no número de microrganismos nas lesões de cárie. Nas lesões de cárie pequenas, não cavitadas, foi encontrada uma maior redução do número de microrganismos após a aplicação de Ozono, do que nas lesões de cárie de maiores dimensões. Neste estudo ainda foi possível verificar que nos casos de lesões de cárie, localizadas mais próximas da margem gengival, também revelaram uma menor redução do número de microrganismos (48). Isto sugere, segundo Baysan *et al*, 2000, que a inversão da lesão de cárie dependerá do seu tamanho e da sua localização (49). De fato, teoricamente, o Ozono pode reduzir a contagem de bactérias em lesões de cárie ativas e, portanto, pode assegurar temporariamente a progressão da lesão de cárie, resultando na prevenção ou desaceleração da necessidade de proceder a restaurações dentárias (53).

Recentemente, Huth *et al*. (48) realizaram um estudo, randomizado e controlado, para avaliarem o efeito da aplicação de 40seg de gás Ozono (HealOzone® [KaVo Dental GmbH, Alemanha]) na progressão ou reversão de lesões de cárie não cavitadas presentes em fissuras oclusais. Este grupo de investigadores recrutou 41 pacientes, com 57 pares de lesões de cáries localizadas em molares permanentes contra-laterais. Os dentes dos pacientes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo de teste de dente (onde cada

dente recebeu o tratamento de Ozono) e o grupo de controlo do dente no qual cada dente foi deixado sem tratamento). Um examinador cego calibrado avaliou a progressão ou reversão da lesão de cárie, através do equipamento DIAGNOdent® [KaVo Dental GmbH, Alemanha]], durante 3 meses. Os resultados indicaram que, nos pacientes com elevado risco de cárie, houve uma redução significativa da progressão da lesão de cárie nas lesões tratadas com Ozono em relação às lesões de cárie do grupo controlo (não tratadas) (48).

Posteriormente, Brazelli *et al.* (54) realizaram uma revisão sistemática para avaliar a eficácia do gás Ozono (HealOzone® [KaVo Dental GmbH, Alemanha]) no tratamento de lesões de cárie de fóssulas e fissuras e em lesões de cárie radicular. Após construírem um modelo de Markov para explorar possíveis aspetos de custo-eficácia do HealOzone®, ao longo de um período de aplicação de 5 anos, verificaram o seguinte: o tratamento convencional adicionando o HealOzone® apresentava um custo superior do que o do tratamento convencional de lesões de cárie não-cavitadas e do que tratamento de lesões de cárie de fissura (£ 40,49 vs 24,78 £); o custo era inferior no tratamento de lesões de cárie radicular não cavitadas adicionando o HealOzone® à terapia convencional em relação ao tratamento convencional *per si* destas mesmas lesões de cárie (£ 14,63 vs 21,45 £). Reiteraram que a evidência atual era insuficiente para se concluir que há benefício na relação custo-eficácia no tratamento das lesões de cárie oclusal e radicular (54). Estes autores chegaram a uma conclusão semelhante e em concordância com a presente na Cochrane library.

O Ozono, apesar de tudo, também possui contraindicações aquando da sua utilização, que se encontram explícitas na tabela 3 (Tabela 3),

---

**Tabela 3 - Ozono-terapia e suas contraindicações**

---

Gravidez

Distúrbios imunitários

Hipertireoidismo

Anemia

Intoxicação alcoólica

Alergia ao Ozono

Enfarte Miocárdio

Controlo da infeção dentária

Aceleração do processo de cicatrização

Remineralização da superfície dentária

---

*Fonte: Saini, R. 2011 (Adaptado e sem autorização do autor).*

## **IMPLANTES EM MEDICINA DENTÁRIA**

A utilização de implantes dentários pela coletividade de médicos dentistas tem vindo a assumir uma importância cada vez maior, dada a evolução, diversidade e disponibilidade dos sistemas de implantes na atualidade. No entanto, é um território que ainda desencadeia algumas incertezas e dúvidas, sobretudo nos casos de perda de implantes e no surgimento de complicações peri-implantares, que numa primeira análise se revelam incompreensíveis e inesperadas (55).

As reabilitações com implantes dentários constituem tratamentos, que podem fornecer resultados previsíveis em termos de estabilidade, retenção, estética e satisfação do paciente. Contudo, uma melhor compreensão dos mecanismos de insucesso da reabilitação oral e de desenvolvimento de complicações biológicas (peri-mucosite e peri-

implantite) em implantes osteointegrados torna-se determinante para a instituição de protocolos eficazes de tratamento e de prevenção destas complicações (55, 56).

As respostas biológicas das células ósseas a diferentes topografias de superfície de implantar constituíram objeto de diversos estudos (57-63). Aliás, estas culturas celulares integram parte dos protocolos de prévios à disponibilização no mercado de novas superfícies implantares (64-66). Características topográficas das superfícies implantares, tais como ranhuras, topos, poços ou pilares podem ter um efeito dramático sobre a composição das camadas de proteínas, podendo mesmo alterar a orientação e a conformação da proteína. Tem sido demonstrado que estas propriedades superficiais, juntamente com outros aspetos, podem ter um impacto significativo sobre as interações específicas desenvolvidas entre a superfície e as células (67). Nesse sentido, há autores que advogam que, na elaboração de estratégias de minimização das reações de corpo estranho, se devem considerar a forma, o tamanho, o espaçamento e a curvatura nas características topográficas das superfícies implantares (67).

A microbiota que se forma sobre superfícies de implantes colocados no corpo humano pode ser altamente resistente a agentes antimicrobianos e, em alguns casos, causar mesmo infeções graves (68). Por conseguinte, para limitar a fixação bacteriana às superfícies destes e, assim, minimizar o risco de infeção do implante, o processo de formação de biofilme e de fixação bacteriana deverá ser bem compreendido. O ambiente oral é considerado um excelente modelo para a investigação sobre a formação de biofilmes e infeção do implante, constituindo objeto de estudo de diversos investigadores no campo da medicina dentária (69-72). Esses estudos mostraram que a rugosidade, a energia livre, e as características do material da

superfície do implante em grande parte determinaram a adesão bacteriana inicial (68).

Os implantes dentários osteointegrados possuem uma taxa de sucesso superior a 90% a longo prazo, mas pode ser ameaçado pela patologia peri-implantar (peri-mucosite e peri-implantite) - condições inflamatórias associadas ao biofilme bacteriano. A peri-implantite, condição que geralmente é precedida por uma peri-mucosite, é caracterizada já por uma destruição inflamatória progressiva da crista do osso alveolar de suporte do implante, por um aumento das profundidades de sondagem e pela hemorragia e/ou supuração à sondagem. Contudo, um tratamento eficaz da peri-mucosite poderá impedir o desenvolvimento da peri-implantite. De fato, é a acumulação de placa sobre a superfície do implante / pilar justaposto ao epitélio de juncional e à zona de tecido conjuntivo do tecido mole que é apontada como um dos principais agentes indutores da peri-mucosite, que pode posteriormente progredir para peri-implantite (73).

No início da década de setenta, o grupo liderado por Brånemark da Universidade de Gotenburgo definiu o termo osteointegração, após as observações efetuadas nos seus trabalhos de estudo da microcirculação óssea em coelhos, iniciados em 1952 (74). Este termo surgiu como consequência da dificuldade do Professor Brånemark extrair as câmaras de Titânio colocadas em perónios de coelhos. Assim, a osteointegração, referia-se a uma união direta entre o Titânio e o tecido ósseo (75). Durante a década de noventa, o conceito de osteointegração foi alterando-se com introdução de aspetos biológicos e bioquímicos à união osso-implante (76-78).

Atualmente, a investigação centra-se no estudo histológico e histomorfométrico da interface superfície do implante-osso e na

implementação de novas superfícies de implantes que visem melhorar a osteointegração e o seu comportamento clínico (55, 79).

## **BIOLOGIA DO PERIODONTO E PATOLOGIA PERIODONTAL**

Em condições normais de saúde gengival, a gengiva apresenta-se com um tom róseo, consistência firme e ausência de hemorragia à sondagem (80) (Figura 1).

O periodonto, em situações de normalidade, é composto pelo conjunto de tecidos do órgão de sustentação e proteção da peça dentária. Classifica-se, de acordo com a sua função, em periodonto de inserção e de proteção. O periodonto de proteção é formado pela gengiva, que faz parte da mucosa oral mastigatória (que reveste os processos alveolares e rodeia o colo dos dentes) e pela união dento-gengival, que une a gengiva à peça dentária (81). O periodonto de inserção é constituído por três estruturas – o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar. As fibras de colagénio do ligamento periodontal inserem-se no cimento radicular e no osso alveolar, formando a articulação alveolo-dentária entre o osso e o dente como evidenciado na Figura 2 (82).



Figura 1 – Esquema comparativo entre um dente saudável e um dente afetado por doença periodontal.

Fonte: American Academy of Periodontology. (Adaptado, sem autorização do autor).

A doença periodontal é uma condição de inflamação crônica, induzida por um biofilme microbiano, associado ao dente e pela resposta imunitária do organismo. O cariz multifatorial, que é atribuído à etiopatogenia da doença periodontal, prende-se com o fato de a mesma também ter sido relacionada com outros fatores, dos quais se destacam o fumo do tabaco e a diabetes *mellitus* (83). De acordo com a classificação das doenças do periodonto, estabelecida no Workshop para a classificação das doenças e condições periodontais, realizado em 1999, o primeiro grupo inclui as patologias gengivais, que não envolvem nem o osso alveolar nem o ligamento periodontal, e as quais são comumente designadas de gengivite (84).



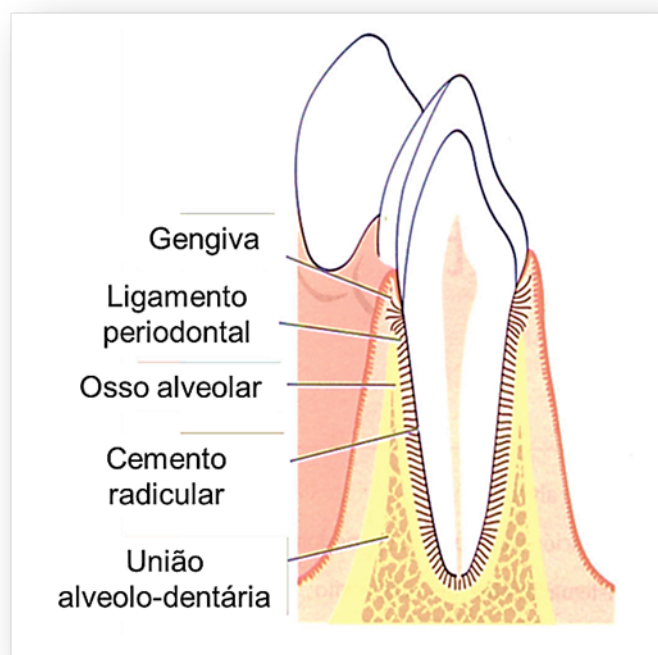


Figura 2 – Ilustração de dente e periodonto em condições de saúde gengival.

Fonte: Vaz, P; 2011. *Introdução*, pag. 62 (Adaptado, com autorização do autor).

A gengivite corresponde a uma inflamação da gengiva, que a torna mais ruborizada, edemaciada, e suscetível à hemorragia de contato (85). É uma condição provocada pela acumulação de placa bacteriana, que pode progredir para um estado mais grave, quando o processo inflamatório se estende ao ligamento periodontal e ao osso alveolar (84). Na maioria dos casos, trata-se de uma condição considerada reversível, desde que a placa bacteriana seja removida. Quando outros fatores relacionados com a sua etiopatogenia que não se encontrem controlados, a mesma poderá perpetuar-se (85). Foi também descrita a existência de uma forte correlação positiva entre os níveis de higiene oral e a presença e severidade da gengivite (85).

A periodontite é uma das causas de perda de tecido conjuntivo, reabsorção alveolar e formação de bolsas, podendo eventualmente levar à perda do dente. As lesões provocadas pela periodontite progridem ao longo do tempo, apesar de poderem co-existir períodos de progressão mais lenta ou mais rápida da patologia (83, 85).

A gengivite é geralmente considerada como uma entidade precursora da periodontite, mas nem todos os processos de inflamação gengival culminam em periodontite (85).

Apesar das doenças periodontais serem desencadeadas pelos biofilmes bacterianos na superfície do dente, a destruição do tecido e a progressão da doença devem-se, primeiramente, segundo diversos autores, aos mediadores das respostas imuno-inflamatórias do hospedeiro em relação aos agentes patogénicos Gram-negativos (86-89).

Estes microrganismos possuem na sua superfície lipolissacarídeos (LPS), que são reconhecidos por recetores envolvidos nas respostas imunológicas do hospedeiro, os *Toll-like receptors* (TLRs). Este reconhecimento leva à estimulação da produção de substâncias pró-inflamatórias, das quais se destacam as citocinas [as interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )] e as quimiocinas [a interleucina 8 (IL-8)], que em conjunto, desencadeiam uma cascata de reações imuno-inflamatórias (83). Por outro lado, estes mesmos mediadores possuem a capacidade de recrutar outras células (fibroblastos e células epiteliais, por exemplo), que produzem prostaglandinas [sobretudo a prostaglandina E2 (PGE2)], as quais concorrem para a reabsorção do osso (através da promoção da atividade dos osteoclastos) e para a destruição do tecido conjuntivo (90) (Figura 3).

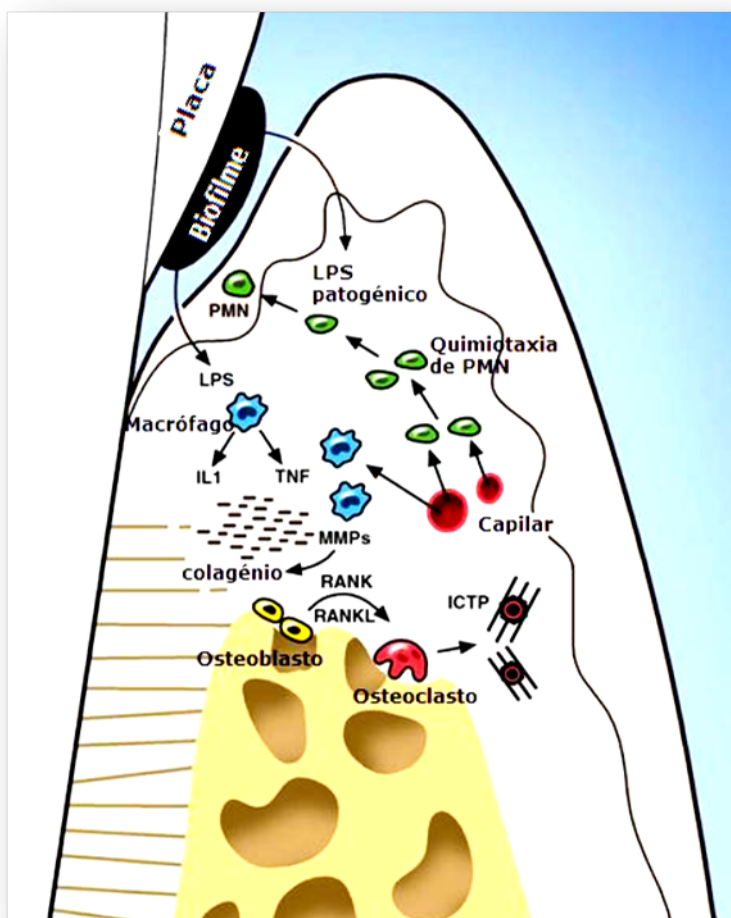


Figura 3 – Esquema representativo da interação placa bacteriana – hospedeiro na etiopatogenia da doença periodontal. (LPS – Lipopolissacarídeo (bateriano), PMN – Polimorfonucleares, MMPs – Metaloproteinase da matriz, IL1 – Interleucina 1, TNF – Fator de necrose tumoral, RANK – Recetor do fator nuclear kappa-B, RANKL – Ligante do recetor do ativador do fator nuclear kappa-B, ICTP – Piridoxilina de ligação ao terminal carboxílico do Telopectídeo do colagénio tipo I).  
Fonte: Taba et al., 2005. (Adaptado, sem autorização do autor).

Segundo alguns investigadores é relevante considerarem-se também todos os eventuais fatores virulentos na etiopatogenia da doença periodontal, ou seja, todo e qualquer componente microbiano capaz

de causar doença no hospedeiro (88, 91). Para estes autores, estes fatores podem ser essenciais para a colonização do hospedeiro ou poderão atuar como antigénios, capazes de causar uma resposta imunológica. Os principais fatores de virulência que foram associados aos agentes periodontopatogénicos incluem: lipopolissacarídeos, proteínas de choque térmico, fímbrias e enzimas extracelulares proteolíticas (85, 92).

## SAÚDE PERI-IMPLANTAR E PATOLOGIA PERIODONTAL

Em condições normais de saúde peri-implantar, os tecidos gengivais peri-implantares apresentam-se com um tom róseo avermelhado e com ausência de hemorragia à sondagem (93) (Figura 4)

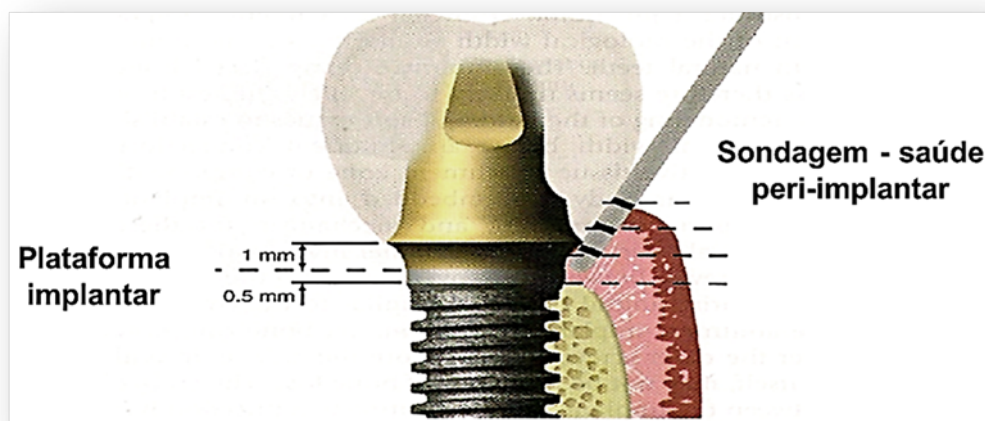


Figura 4: Esquema ilustrativo sobre a biologia peri-implantar.

Fonte: Vaz P, 2011. *Introdução*, pag. 79 (Adaptado, com autorização do autor).

Os tecidos que envolvem o implante, habitualmente designados por peri-implantares, são compostos por uma parte de tecido duro (osso lamelar e medular) e por outra parte de tecido mole (a mucosa peri-implantar) (88).

A mucosa peri-implantar é constituída por dois tipos de tecidos - epitelial e conjuntivo (56). Esta mucosa possui funções similares à gengival, sendo a principal função a proteção do osso subjacente. Esta mucosa forma-se quando ocorre a colocação de implantes, levando ao aparecimento de uma camada de coagulação, que contém uma rede de fibrina, eritrócitos e neutrófilos (56).

O tecido conjuntivo peri-implantar é revestido externamente por um epitélio queratinizado, que está em continuidade com um fino epitélio não queratinizado (com poucas camadas celulares), voltado para a superfície do implante, sendo a sua extensão denominada por barreira conjuntiva, a qual, apresenta diferentes características dependendo da sua inserção (56).

Enquanto que no dente as fibras colagénicas se inserem no cemento radicular, as fibras colagénicas da barreira conjuntiva estão organizadas paralelamente à superfície do implante estendendo-se desde a crista óssea até à margem peri-implantar (94).

A composição do tecido conjuntivo à volta do implante não é estática, diferindo, sobretudo em relação à composição do tecido conjuntivo à volta do dente, pelo seu maior conteúdo de fibras colagénicas e menor conteúdo de células e vasos sanguíneos (95).

Pelo acima exposto, há quem defenda que o tecido peri-implantar seja muito suscetível à colonização bacteriana, resultando, aquando dessas situações, em peri-mucosites, em peri-implantites e em perdas dos implantes endósseos (95). Tais consequências são atribuídas a um selamento biológico ineficaz, como consequência da ausência de cemento e ligamento periodontal, a orientação das fibras e a vascularização (95).

Em contraste com o tecido peri-implantar, a vascularização no tecido gengival provém de três fontes, entre elas, do ligamento periodontal, do septo ósseo e do periósseo (96). Devido a inexistência do ligamento periodontal, a vascularização no tecido peri-implantar fica a cargo dos vasos sanguíneos presentes no perióstio e no tecido gengival. Assim, a vascularização no tecido peri-implantar é reduzida, em comparação com a presente no dente, e concorre diretamente para a restrição dos mecanismos de defesa de resposta regenerativa á volta dos implantes endósseos (95).

Quanto ao sulco peri-implantar e ao sulco periodontal, estes são tecidos moles que se distinguem pelas características das fibras do seu tecido conjuntivo (97). De acordo com alguns estudos, no sulco peri-implantar existem fibras de tecido conjuntivo com orientação paralela, mas sem inserção no implante dentário. Já no sulco periodontal as fibras do tecido conjuntivo estão ligadas ao dente (97, 98).

A doença peri-implantar corresponde ao conjunto de alterações patológicas dos tecidos peri-implantares. Numa fase inicial da doença peri-implantar surge uma alteração inflamatória confinada aos tecidos moles que rodeiam o implante, que se designa por peri-mucosite (99, 100).

O início da perda óssea associado à permanência da inflamação dos tecidos moles peri-implantares dá lugar à peri-implantite, uma situação crónica que pode terminar mesmo com a perda do implante dentário (99, 100).

Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da peri-mucosite e evolução da mesma para a peri-implantite, seja um processo inflamatório instalado, devido à acumulação de placa bacteriana (101, 102). No entanto, alguns autores sugeriram que a

progressão clínica desta patologia possa ser influenciada pelo tipo de resposta do hospedeiro às toxinas bacterianas (55, 103, 104).

A peri-implantite é, deste modo, considerada, à semelhança do que ocorre na periodontite, uma resposta inflamatória do hospedeiro associada à perda do suporte ósseo do implante. A presença de determinadas bactérias patogénicas, bem como vários outros fatores ambientais (tais como patologias sistémicas, tabagismo, consumo de álcool, sobrecarga oclusal) e fatores genéticos foram apontados na etiologia da peri-implantite (55, 99, 102, 105).



Figura 5: Esquema ilustrativo sobre a peri-implantite.

Fonte: Kan-Zhi Liu, 2011 Adaptado, sem autorização do autor).

## **MICROBIOTA PERIODONTAL E PERI-IMPLANTAR**

Desde do tempo de Anton von Leeuwenhoek que se sabe que a cavidade oral é colonizada por agentes microbianos, ainda que este investigador, por falta de recursos tecnológicos, os descrevesse como *animalcules* (37). Atualmente verifica-se que estes agentes, na sua maioria bactérias, constituem a designada placa bacteriana (106).

O papel da placa bacteriana no desenvolvimento da doença periodontal foi sobejamente estudado e comprovado por estudos clínicos, nos quais os tratamentos mecânicos e antibacterianos se mostraram eficazes na prevenção da referida doença (85, 92, 106).

Na compreensão da etiologia da doença periodontal, é importante atentar para que a placa bacteriana é um biofilme, isto é, um conjunto de células e microcolónias envolvidas numa matriz altamente hidratada, que consiste num exopolímero aniónico (85). Num biofilme são conferidas propriedades às bactérias, que não se encontram nessas mesmas bactérias, quando estas se encontram suspensas apenas num fluído (85). Estas propriedades podem ser classificadas em quatro grandes categorias: comunicação intercelular, transferência génica, resistência antimicrobiana e regulação da expressão de genes (85).

Verifica-se ainda alguma controvérsia no que toca ao modo como a placa bacteriana causa a doença periodontal. Determinados autores defendem que esta é provocada pela generalidade da placa (hipótese da placa não específica), enquanto que outros autores defendem que a referida doença periodontal está dependente da presença de agentes periodontopatogénicos específicos (hipótese da placa específica) (85). Apesar desta última hipótese ser considerada lógica, a mesma possui uma grande questão, de difícil defesa – note-se que a doença periodontal ocorre em locais onde já existem colónias bacterianas, logo é possível que a doença seja causada



quer pela proliferação anormal de bactérias residentes, quer pela colonização por agentes patogénicos exógenos – portanto a dúvida persiste relativamente à origem dos agentes periodontopatogénicos específicos (70, 72, 85).

Os microrganismos patogénicos que colonizam o sulco periodontal na cavidade oral encontram-se geralmente organizados em seis grupos (complexos), os quais se apresentam intimamente relacionados (107).

Neste contexto, Socransky *et al.* (1998) examinaram as relações existentes entre as espécies bacterianas na placa subgengival com a doença periodontal crónica. Utilizando o método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* avaliaram 13.261 amostras de placa subgengival. Os autores demonstraram a existência de associações entre as espécies bacterianas estudadas, as quais foram agrupadas da seguinte forma: complexo vermelho, composto por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *Treponema denticola*; complexo laranja, composto por subespécies de *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*; complexo verde, formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*), *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por espécies de *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e complexo roxo, composto de *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Este mesmo estudo demonstrou,

ainda, a existência de relações entre os complexos, de forma que, por exemplo, o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho. Também foram observadas as relações existentes entre certos complexos e aspetos clínicos da doença periodontal (108) (FIGURA 6).

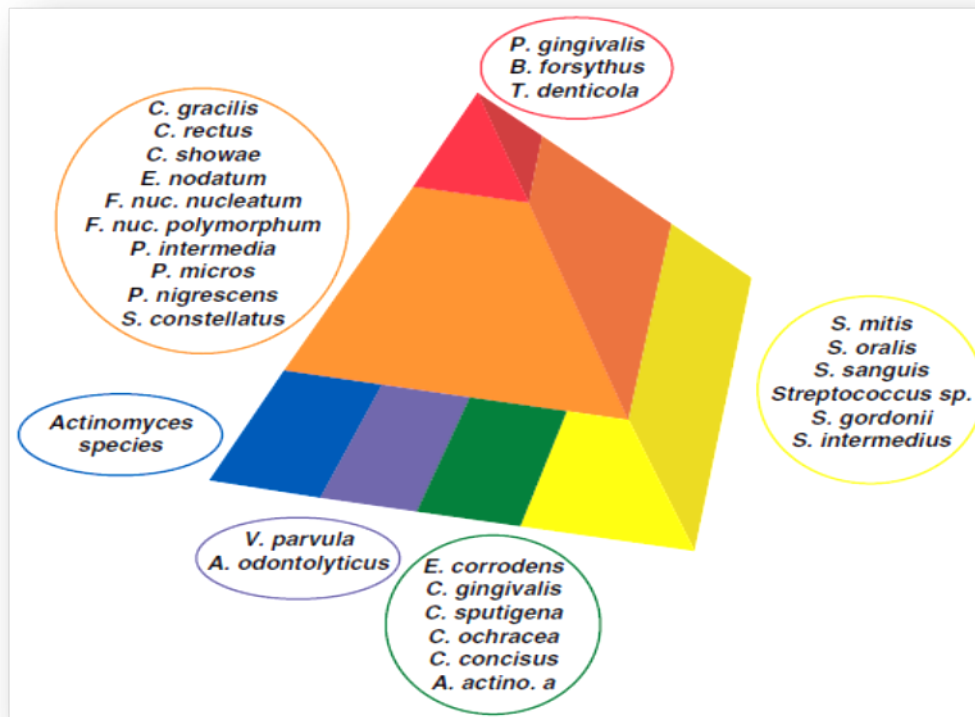


Figura 6: Hierarquização do nível de risco para desenvolvimento de periodontite associado às espécies bacterianas.

Fonte: Dumitrescu, AL, 2010 (Sem autorização do autor).

Os microrganismos patogénicos que foram associados à doença periodontal pertencem maioritariamente ao grupo das bactérias Gram-negativas anaeróbias, incluídas nos complexos laranja e vermelho (109).

Embora seja sobejamente descrito que a microflora que coloniza o sulco gengival na periodontite é muito semelhante à presente em casos de peri-implantite (73, 97, 100), existem alguns investigadores

que acreditam que as bactérias periodontopatogénicas dos complexos vermelho e laranja estão sobretudo envolvidas na rejeição/perda do implante (73, 88). Segundo estes autores, caso no momento da cirurgia de colocação do implante ocorra colonização de uma elevada quantidade de bactérias anaeróbias Gram-negativas, sobretudo dos grupos *Fusobacterium*, *Spirochaetes*, *Bacteroides*, *Prevotella* (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescences*), a *Porphyromonas gingivalis*, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, desenvolve-se uma peri-implantite e o implante acaba por ser rejeitado e perdido (73). Este grupo de investigação reforçou ainda o fato de determinados microrganismos, que apesar de apresentarem características semelhantes aos microrganismos periodontopatogénicos, que se encontram presentes na placa bacteriana que envolve os dentes em situações de saúde gengival, foram associados a patologia peri-implantar (73). Destaca-se ainda no estudo de Persson GR *et al.*, 2013, que foram encontradas dezanove espécies de bactérias, em contagens mais elevadas, em implantes com peri-implantite, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus anaerobius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* ( $p < 0,001$ ). Após a análise da curva característica de operação do receptor identificado para a *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. socranskii*, *Staph. aureus*, *Staph. anaerobius*, *Strep. intermedius* e *Strep. mitis* na peri-implantite, compreendendo 30% da microbiota total, terminaram por concluir que a *Tannerella forsythia* e *Staphylococcus aureus* eram bactérias que estão associadas com a peri-implantite (110).

Apesar destas pequenas diferenças quanto à microflora peri-implantar, a colonização das bactérias no sulco peri-implantar ocorre de uma forma muito similar à ocorrida no sulco gengival dentário (73). Assim, as bactérias aderem inicialmente à parte supragengival do implante e/ou dos componentes protéticos e posteriormente colonizam em direção ao sulco peri-implantar (73)

Os primeiros colonizadores implantares são os cocos e os bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativos, tais como os *Streptococcus oralis* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus sanguis*). Este grupo de bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativos possuem a capacidade de produzirem a IgA protease, fato que justifica, segundo alguns autores, a sua permanência e abundância no sulco peri-implantar (111).

Fato assente é que logo que se dê início à acumulação da placa bacteriana, começa o recrutamento de neutrófilos para o sulco peri-implantar, devido sobretudo aos péptidos quimiotáticos libertados pelas bactérias (112).

Alguns estudos (Graves & Cochran 2003, Schierano *et al.*, 2008, Vaz *et al.*, 2012) apontam mesmo que o dano tecidual peri-implantar é provocado mais pela resposta imunológica do que propriamente pela ação bacteriana direta (55, 113, 114).

Enquanto as bactérias danificam o epitélio celular, promovem em simultâneo a libertação de citocinas, que atraem leucócitos, especialmente neutrófilos, os quais, por sua vez, perpetuam a produção de citocinas. E é, precisamente, quando esta concentração de neutrófilos e a barreira epitelial não forem suficientes para travarem a placa bacteriana que se dará início ao processo inflamatório, conhecido como peri-mucosite. Este processo, tal como já foi repetidas vezes referido, ainda que reversível, poderá

evoluir com destruição óssea e dar lugar à entidade então designada de peri-implantite (112).

No estudo da doença peri-implantar a análise do fluido crevicular peri-implantar (PICF) tem vindo a ter um incremento, enquanto método de estudo da resposta imunológica, sobretudo pela fato de constituir uma técnica rápida, eficaz e não invasiva (115). Diferentes moléculas pró-inflamatórias podem ser encontradas no PICF, nomeadamente citocinas. Estas últimas, constituem proteínas secretadas pelas células imunitárias, que intervêm na função de diversos tipos celulares. São também consideradas como mensageiros intracelulares solúveis, que surgem no PICF, como resultado da interação das células da mucosa peri-implantar com os leucócitos. Por este motivo são consideradas por algumas investigações recentes como potentes indicadores de diagnóstico da destruição do tecido peri-implantar (115, 116).

Dentro destas moléculas pró-inflamatórias, que poderão eventualmente ser encontradas no PICF, revelam-se de particular interesse a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , diversas outras citocinas pró-inflamatórias (que participem na destruição tecidular e na produção de metaloproteinases da matriz (MMP) e a prostaglandina E2 (112). Ao contrário destes autores, existem outros que acreditam que a informação dada pela análise do PICF ainda possui muitas reservas quanto à validade de algumas moléculas, enquanto marcadores de diagnóstico de patologia peri-implantar (116).

## OBJETIVOS E JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Na realidade da literatura internacional ainda não existem estudos suficientes que promovam ou contestem os efeitos do Ozono na superfície dos implantes e consequentemente na sua validade enquanto agente bactericida peri-implantar.

Deparamo-nos com o fato de ainda persistirem dúvidas pertinentes, que importa esclarecer, quanto ao efeito *in vitro*, do Ozono na superfície dos implantes e na flora oral para se poderem avançar para estudos *in vivo* sobre os efeitos do Ozono na microflora peri-implantar e consequente aplicabilidade deste tipo de dispositivos de Ozono na terapêutica de patologia peri-implantar infecciosa.

O objetivo geral desta dissertação de candidatura ao grau de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto foi estudar o impacto da aplicação do Ozono numa superfície de implantes, como forma de avaliar o potencial do Ozono no tratamento da doença peri-implantar, devido ao seu potencial antimicrobiano. Como objetivos específicos, propusemo-nos avaliar o impacto de uma aplicação única na estrutura da superfície implantar de Titânio e o efeito em tempo progressivo, quando aplicado o Ozono nessa mesma superfície. De forma complementar procuramos avaliar qual o efeito antimicrobiano numa cultura de bactérias associadas à peri-implantite após aplicação do Ozono.

Apresentam-se desta forma três questões de investigação, as quais se pretenderá dar resposta com este estudo:

1. Quais os efeitos estruturais provocados pela aplicação do Ozono numa superfície implantar tratada quimicamente com um ataque ácido?

2. Quais os efeitos estruturais da aplicação progressiva do Ozono na mesma área de uma superfície implantar tratada quimicamente com um ataque ácido?
3. Quais os efeitos antimicrobianos da aplicação do Ozono numa superfície implantar tratada quimicamente com um ataque ácido?





# MATERIAL E MÉTODOS

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

O presente estudo decorreu no período de Novembro de 2010 a Abril de 2013 no âmbito do Mestrado em Cirurgia Oral, tendo sido realizado em colaboração com as Universidade do Minho e Universidade Católica Portuguesa, as quais possuíam todas as condições indispensáveis para fornecimento dos materiais e ensaios a serem realizados.

## **SELEÇÃO DA AMOSTRA**

A amostra deste estudo foi composta por uma totalidade de 20 discos de Titânio com uma superfície tratada quimicamente por aplicação de um ataque ácido, desenvolvida pelo Centro de Tecnologia e Materiais (CTM2) da Universidade do Minho.

A determinação da dimensão da amostra, isto é, do número de discos a incluir no estudo foi baseada em literatura internacional publicada recente e relacionada (35, 117).

A seleção dos meios de cultura e das bactérias a serem cultivadas sobre os discos de Titânio também foi igualmente baseada em literatura internacional publicada recente e relacionada (117).

## **PREPARAÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO**

A preparação dos discos de Titânio foi efetuada na íntegra no laboratório do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho, sob direção do Prof. Doutor Luís Augusto Rocha.

Foram utilizadas 20 amostras/discos de Titânio com 1 cm<sup>2</sup> de área (Figura 7).

Estas sofreram um tratamento de superfície, que incluiu uma preparação química, por aplicação de um ataque ácido (ácido fluorídrico + ácido nítrico + água na proporção 1:1:1).



Figura 7 – Amostras de Titânio sem preparação.

A preparação das amostras/espécimenes de Titânio foi efetuada de acordo com o protocolo que se descreve de seguida.

- Preparação de uma solução ácida contendo HNO<sub>3</sub>, HF e H<sub>2</sub>O em proporções iguais (1:1:1): após se pipetarem 10ml de H<sub>2</sub>O, 10ml de HF e 10ml de HNO<sub>3</sub>, estes foram adicionados e misturados em goblet de plástico com uma vareta de homogeneização.

- Ataque ácido das amostras de Titânio: as amostras de Titânio foram colocadas num recipiente de plástico e de seguida foram adicionados os 30ml da solução ácida, com agitação leve do recipiente (Figura 8).



Figura 8 – Colocação das amostras de Titânio em recipiente de plástico.

Aguardou-se o período necessário para que ocorresse a libertação de vapores de coloração amarela do recipiente e após o início desta libertação, respeitou-se o período de espera de 4 a 5 segundos, para que a libertação dos vapores fosse completa. Esta libertação de gases foi efetuada numa Hotte, que permite o cumprimento das normas de segurança na extração de gases (Figura 9).



Figura 9 – Libertação de vapores de coloração amarela do recipiente com as amostras de Titânio (procedimento realizado numa Hotte).

Imediatamente depois adicionou-se água, de forma abundante, ao recipiente que continha as amostras e a solução ácida, com a finalidade de interromper a reação (Figura 10).

Toda a solução final, presente no recipiente com as amostras, foi vertida para fora do referido recipiente e continuou-se a adicionar água no mesmo recipiente, de forma a eliminar quaisquer vestígios do ácido.

- Limpeza das amostras: os espécimes de Titânio foram colocados num goblet com propanol para se proceder à limpeza dos mesmos. Logo de imediato aplicou-se o ultrassom durante 15 minutos (min.) e passou-se à secagem dos espécimes de Titânio (Figura 11).

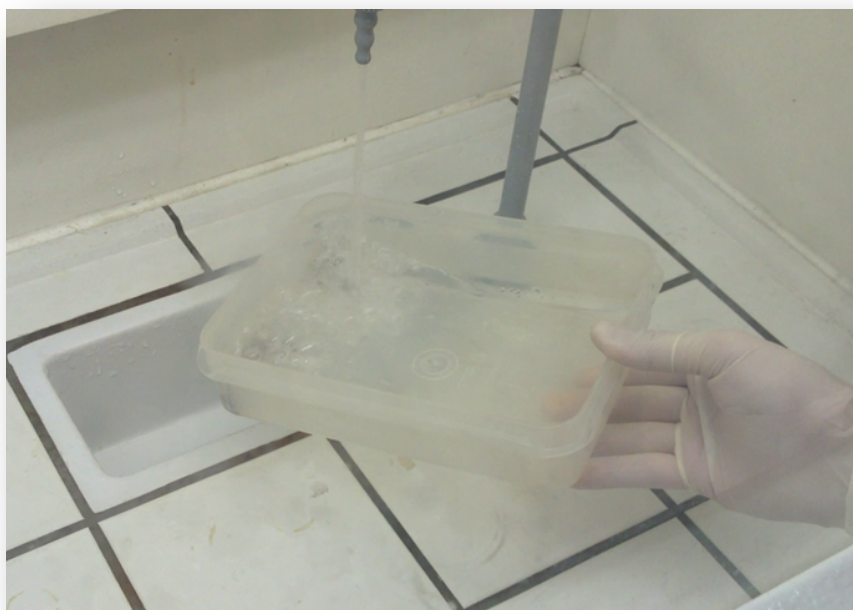


Figura 10 – Adição de água ao recipiente com a solução e as amostras.



Figura 11 – Colocação das amostras num goblet com propanol e procedimento de limpeza das amostras por ultrassom.

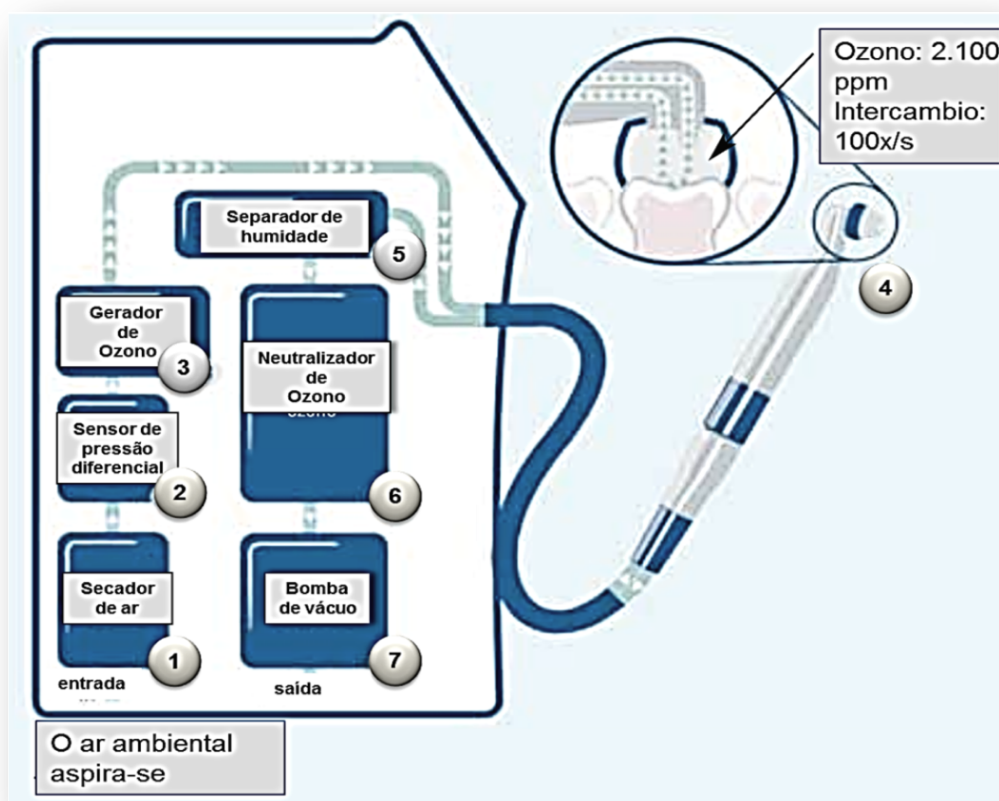
## APLICAÇÃO DO OZONO

A aplicação do Ozono, nos espécimes de Titânio a serem testados, foi efetuada com o Ozono na forma de gás, com recurso ao equipamento KaVo HealOzone® (KaVo Dental GmbH, Alemanha). Este equipamento gera o seu agente ativo a partir do Oxigénio existente no ar ambiental. Esse oxigénio é levado à zona de tratamento e/ou área de intervenção terapêutica, através do vácuo exercido pelo dispositivo de silicone que possui. Uma vez decorrido o tempo de atuação, proposto pelo fabricante nos diferentes protocolos de tratamentos que possui, este equipamento aspira completamente todo o Ozono e, após o seu uso, volta a decompô-lo em Oxigénio. O mecanismo de funcionamento e modo de ação do

equipamento HealOzone ® encontra-se ilustrado na Figura 12 (Figura 12).

Da globalidade das 20 amostras de Titânio preparadas, foram selecionadas aleatoriamente, 12 para a realização da análise do efeito da aplicação do Ozono nas suas superfícies (Figura 13). Esta análise de superfícies foi efetuada através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV) (Figura 14). Este tipo de análise de microscopia utiliza um feixe de eletrões que varre a amostra e produz imagens de alta resolução da superfície da referida amostra. As imagens de MEV possuem uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma amostra. Adicionalmente, de modo a aumentar a condutividade das amostras foi realizada a deposição de ouro/platina através de *sputter coater* (Figuras 15, 16, 17). Trata-se de um procedimento que foi realizado para prevenir a acumulação de campos elétricos estáticos na amostra, devido a irradiação elétrica durante a produção da imagem. Os recobrimentos usualmente utilizados podem ser também de platina, tungstênio e grafite. Outra razão para a metalização, mesmo quando há condução mais do que suficiente, é a melhoria do contraste, embora seja uma condição mais comum em microscópios eletrónicos de varrimento por emissão de campo (*field emission SEM*).





1. Secador de ar: com sensor de humidade automático controla a estabilidade da humidade do ar e ao mesmo tempo mantém uma concentração homogênea do Ozono no dispositivo de silicone.
2. O sensor de pressão diferencial: regista as perdas de vácuo e ativa o gerador de Ozono.
3. O gerador de Ozono, de sistema fechado, gera o Ozono a partir do Oxigénio do ar.
4. A concentração de Ozono, de 2.100 ppm e com um intercâmbio de aproximadamente 100 x/s transmite-se ao dispositivo de silicone, que se mantém hermético.
5. O separador de humidade impede que a humidade aceda ao neutralizador de Ozono.
6. O neutralizador de Ozono descompõe o ozono em oxigénio e a saída do ar neutro no consultório.
7. A bomba de vácuo controla a baixa pressão para que o Ozono não possa sair por alguma causa relacionada com o sistema.

Figura 12 – Ilustração do mecanismo de atuação do equipamento HealOzone® (KaVo Dental GmbH, Alemanha).

Fonte: HealOzone® (KaVo Dental GmbH, Alemanha) (Adaptado, com autorização do autor).





Figura 13 – Aplicação de Ozono através do HealOzone® na superfície de Titânio preparada quimicamente com um ataque ácido.

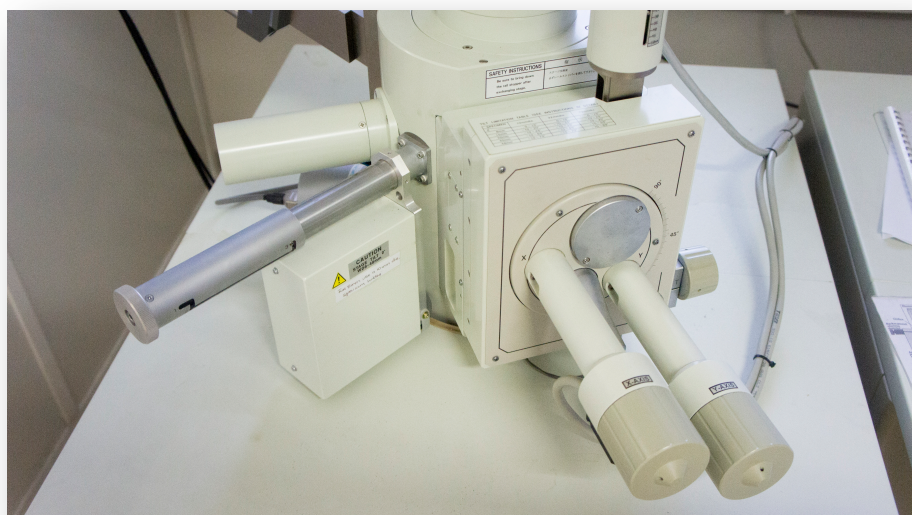


Figura 14 – Microscópio eletrónico de varrimento (MEV) (JEOL-5600 Lv microscope (Tokyo, Japan)).

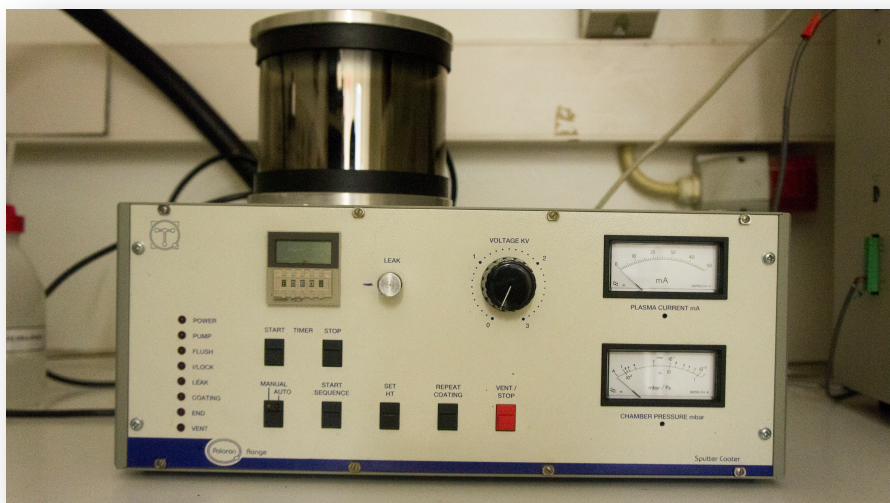


Figura 15 – Sputter Coater para obtenção de recobrimento de ouro das amostras de Titânio (Polaron, Bad Schwalbach, Germany).



Figura 16 – Colocação de 6 amostras de Titânio previamente preparadas com Ozono para deposição de ouro através de Sputter Coater (Polaron, Bad Schwalbach, Germany).

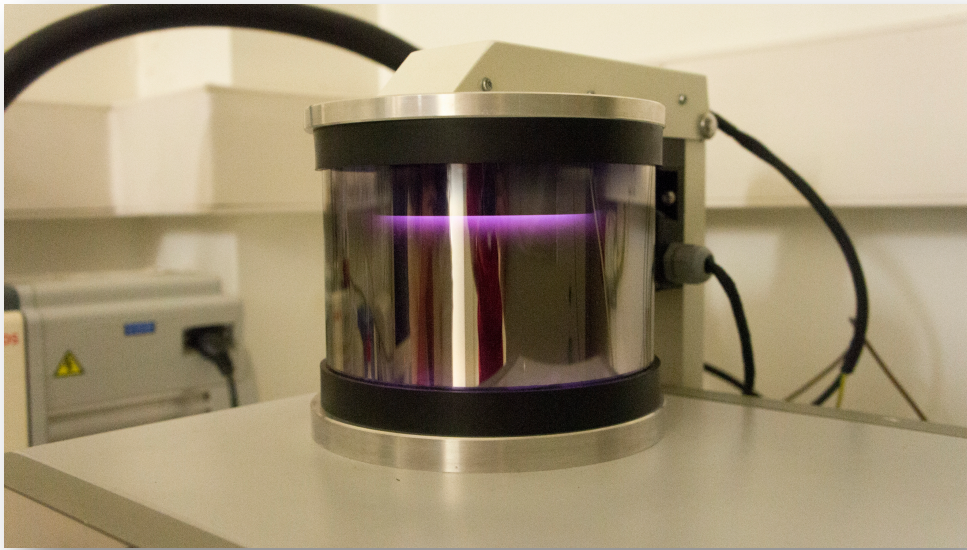


Figura 17 – Deposição de ouro na amostras de Titânio através de Sputter Coater (Polaron, Bad Schwalbach, Germany).

A distribuição dos discos de Titânio para a análise dos efeitos do Ozono sobre a superfície estudada encontra-se esquematizada na Figura 18 (Figura 18). Estas 12 amostras foram divididas em 4 grupos, compostos por 3 discos em cada grupo: o grupo 1, composto por discos sem aplicação do Ozono; o grupo 2, formado por discos com a aplicação de 30 seg de Ozono e avaliação imediata da superfície por MEV o grupo 3, constituído por discos com aplicação de 60 seg de Ozono e análise imediata dos efeitos na superfície por MEV, o grupo 4, formado por discos com aplicação de 60 seg de Ozono e avaliação posterior dos seus efeitos na superfície em estudo.



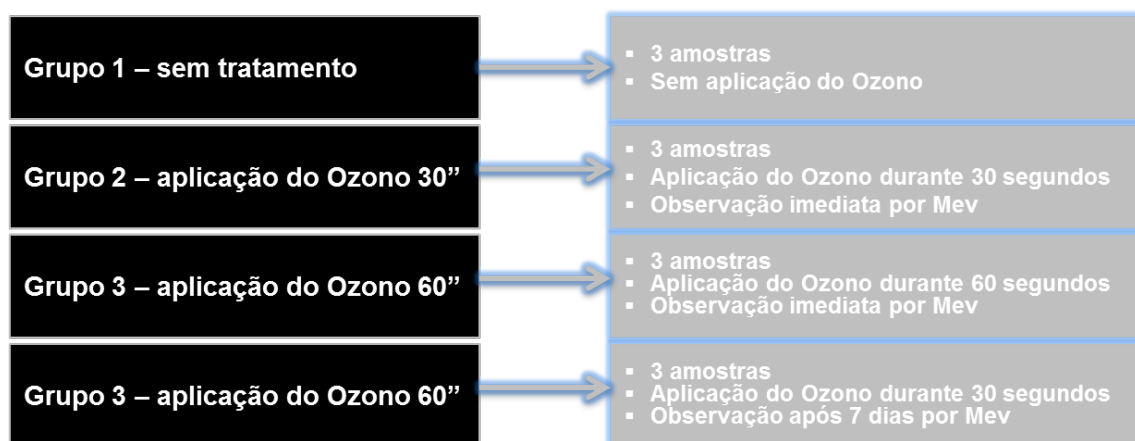


Figura 18 – Esquematização da distribuição dos discos de Titânio em 4 grupos para aplicação do Ozono com o equipamento HealOzone® e posterior análise da superfície.

## ANÁLISE DO EFEITO DO OZONO NO BIOFILME ORAL

O efeito do Ozono na formação de biofilme foi testado através da inibição da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 25293). Para tal, discos de Titânio com 1 cm<sup>2</sup> de área foram colocados em contacto, em microplacas de 24 poços (Figura 19), com inóculo de *S. aureus* crescido *overnight* (1x10<sup>8</sup> UFC/ml) durante 30 min. Seguidamente, cada disco foi tratado com jato de Ozono durante 40 segundos (seg), usando o HealOzone® (KaVo Dental GmbH, Biberach, Germany) e incubados durante 48 h a 37 °C em Tryptic Soy Broth (Difco®), suplementado com glucose a 1% (Sigma-Aldrich®). Paralelamente, dois controlos foram também avaliados. No primeiro, controlo positivo, os discos foram inoculados e seguidamente incubados sem qualquer tratamento. No segundo, controlo negativo, os discos não foram inoculados e seguidamente foram sujeitos ao Ozono e a uma posterior incubação. Após 48h os discos foram recuperados e após diluições decimais (Figura 20 e Figura

21), o número de unidades formadoras de colónias (UFC) foi determinado através do método da gota (Figura 22), como descrito por Miles & Misra (118), em Plate Count Agar (Merck®). As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Em termos de avaliação da capacidade de inibição de crescimento de unidades formadoras de colónias do *S. aureus*, a mesma foi efetuada aplicando a seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição} = 100 - (\text{LOG UFC}_{\text{AMOSTRA COM OZONO}} / \text{LOG UFC}_{\text{AMOSTRA SEM OZONO}}) \times 100.$$

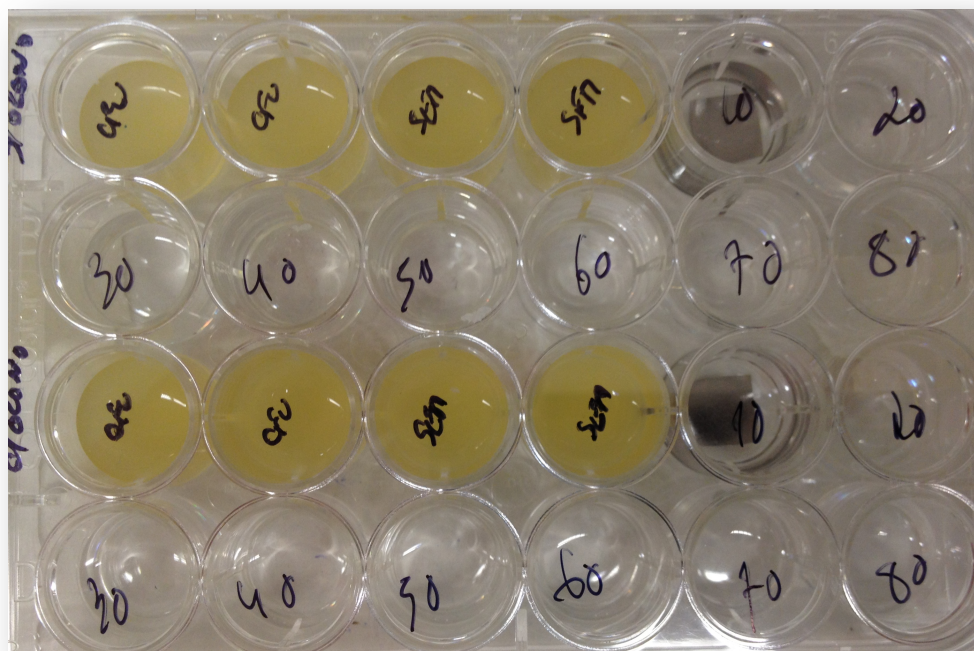


Figura 19 – Microplaca de 24 poços representativa da metodologia utilizada na avaliação do efeito de Ozono sobre biofilmes bacterianos.

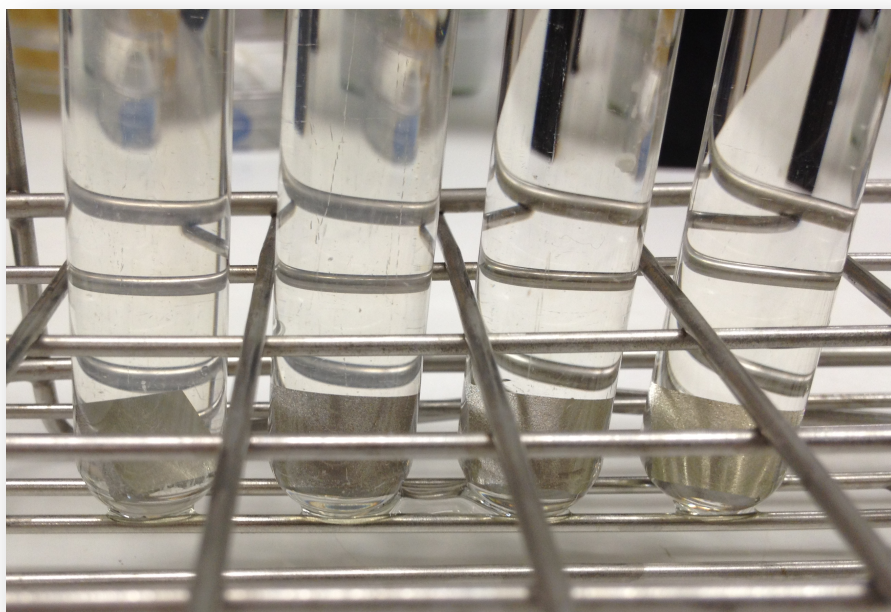


Figura 20 – Fotografia exemplificativa do processo de diluição decimal para enumeração de microrganismos viáveis.



Figura 21 – Detalhe de placas inoculadas para enumeração de microrganismos viáveis.



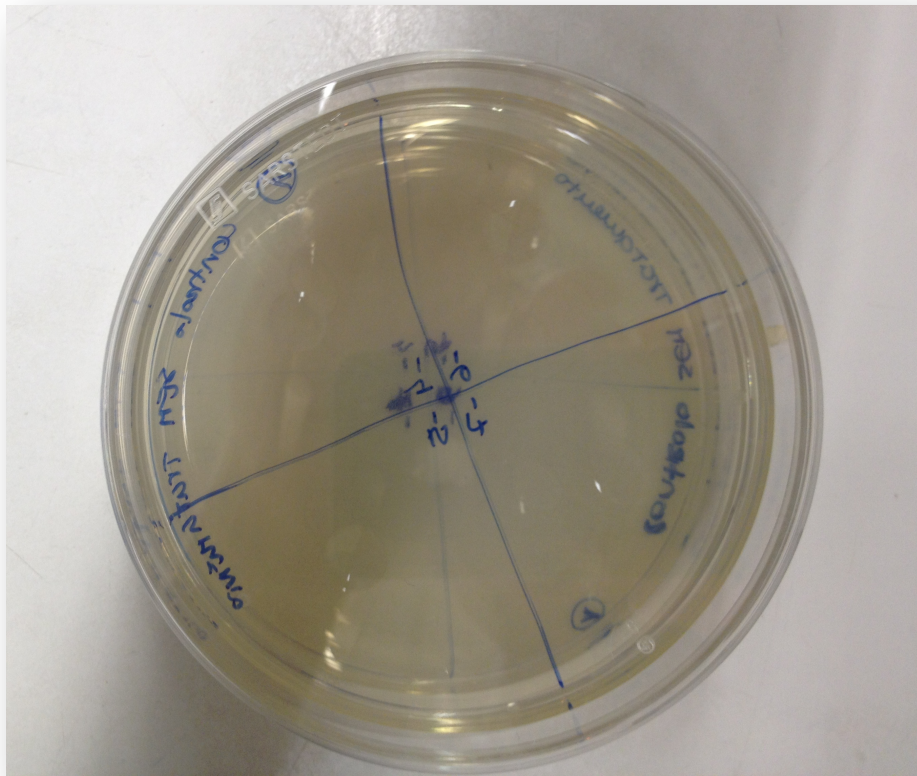


Figura 22 – Detalhe de placa de petri exemplificando o plaqueamento pelo método de Miles & Misra.

Paralelamente foi também feita a análise observacional da superfície das amostras de Titânio com as culturas de *Staphylococcus aureus*, com recurso à microscopia electrónica de varrimento.

## TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras dos discos de Titânio, após finalizado o tratamento de superfície, foram todas codificadas e através de um algoritmo de seleção aleatória, distribuídas nos grupos correspondentes conforme o esquema da Figura 23.

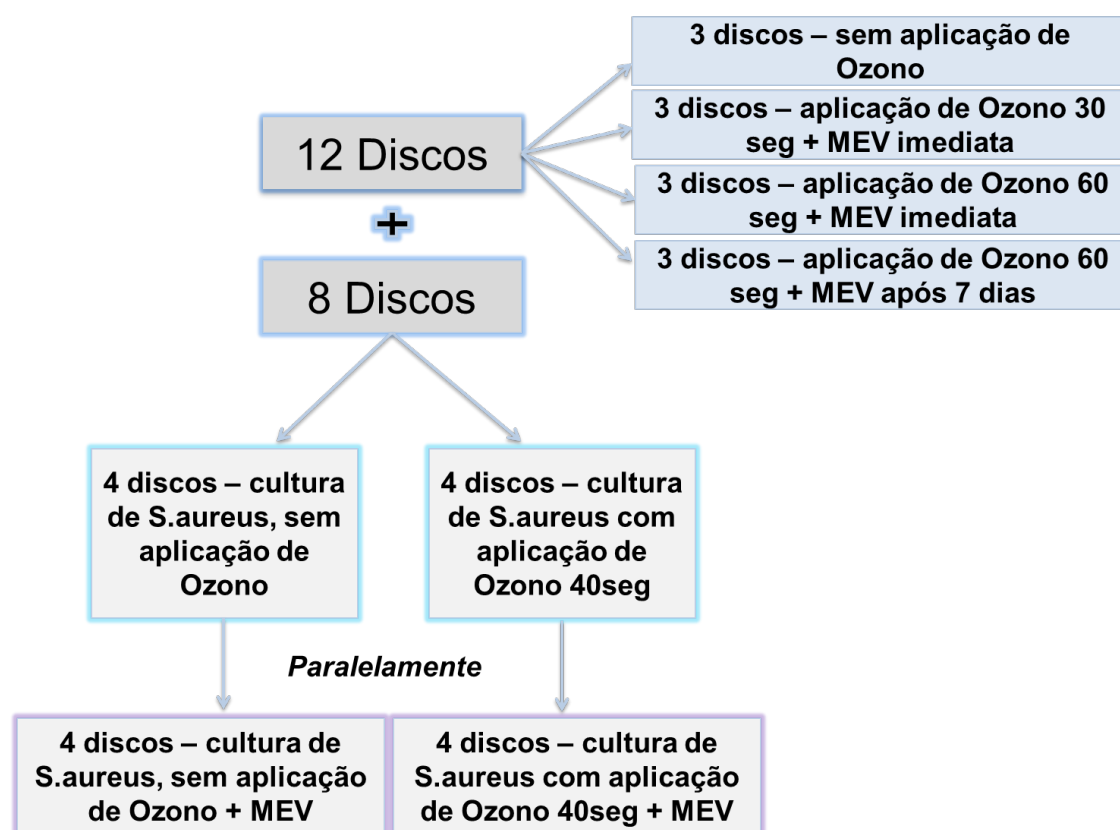


Figura 23 – Diagrama de distribuição dos discos de Titânio para as respectivas análises efetuadas.

Assim, foram utilizados 12 discos para o estudo observacional de avaliação dos efeitos da aplicação do Ozono nas superfícies dos discos de Titânio e foram utilizados 8 discos para realização de um estudo comparativo do efeito da aplicação do Ozono na inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* nos discos de Titânio.

No estudo comparativo, os dados foram tratados, recorrendo ao software estatístico Graphpad PRISM, versão 4.0 (GNU, General Public License) (119). Este software, através da análise dos dados, permite a seleção do teste estatístico mais adequado para a respetiva comparação.

Paralelamente a este estudo comparativo, foi também realizado, um estudo observacional por microscopia electrónica de varrimento, da superfície dos mesmos 8 discos de Titânio.



Todas as observações efetuadas das amostras em microscopia eletrónica de varrimento foram efetuadas sempre pelos mesmos dois observadores, devidamente calibrados, de forma independente e para as quais estavam duplamente cegos .



# RESULTADOS

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

## **EFEITO DO GÁS OZONO NA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO**

A análise à superfície dos discos de Titânio, tratada com um ataque ácido, efetuada através do microscópio eletrónico de varrimento (MEV), evidenciou, na generalidade dos grupos das amostras (12 amostras, divididas em 4 grupos, cada um com 3 discos), uma microestrutura característica das superfícies de Titânio obtidas, encontrando-se cavidades sobrepostas com micro poços, devido ao tratamento de condicionamento ácido. A avaliação por MEV permitiu também verificar que a rugosidade da superfície dos discos Titânio não revelou diferenças morfológicas entre os 4 grupos deste estudo [grupo 1 - discos sem aplicação do Ozono (Figuras 24A, 24B, 25C), grupo 2 - discos com a aplicação de 30 seg de Ozono e avaliação imediata da superfície por MEV (Figuras 25A, 25B, 25C), grupo 3 - discos com aplicação de 60 seg de Ozono e análise imediata dos efeitos na superfície por MEV (Figuras 26A, 26B, 26C), grupo 4 - discos com aplicação de 30 seg de Ozono e avaliação posterior dos seus efeitos na superfície (Figuras 27A, 27B, 27C)]. Assim, apurou-se que na generalidade das amostras, as superfícies dos discos de Titânio não apresentaram alterações topográficas, com ou sem o protocolo de aplicação do Ozono gasoso definido para este estudo, com o equipamento HealOzone®, tal como ilustrado nas Figuras 24A, 24B, 24C, 25A, 25B, 25C, 26A, 26B, 26C, 27A, 27B, 27C.

Também foi possível observar que não foram detetados quaisquer artefactos estranhos, nem nenhuma característica topográfica diferente, nas amostras das superfícies de Titânio sem tratamento com Ozono.

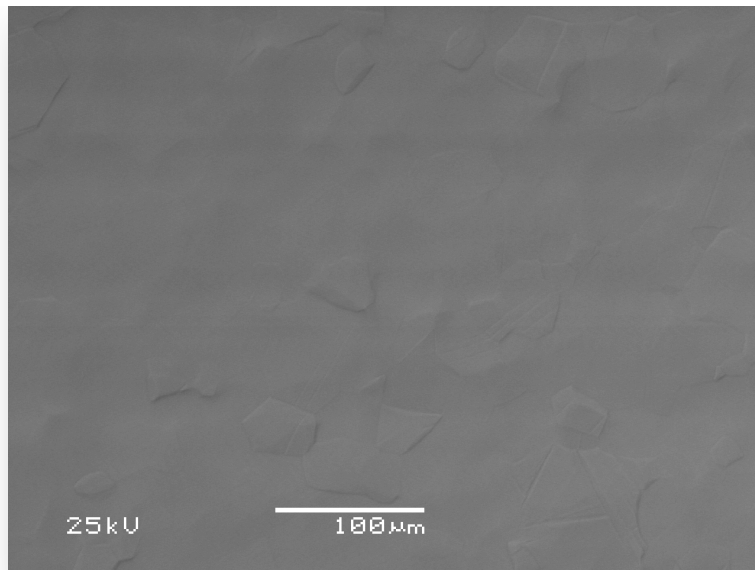


Figura 24A – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio sem tratamento com Ozono (grupo 1). (Ampliação 250x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

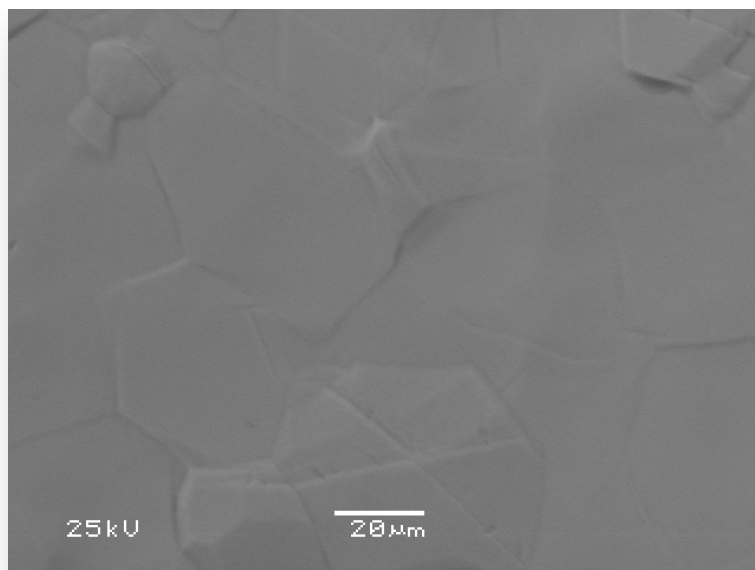


Figura 24B – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio sem tratamento com Ozono (grupo 1). (Ampliação 750x; Voltagem 25kv; Spot Size: 37).

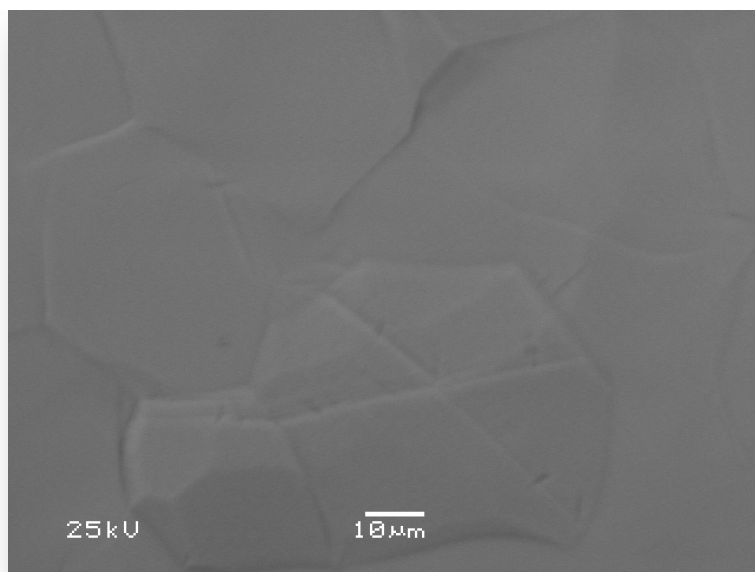


Figura 24C – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio sem tratamento com Ozono (grupo 1). (Ampliação 1000x; Voltagem 25kv; Spot Size: 37).

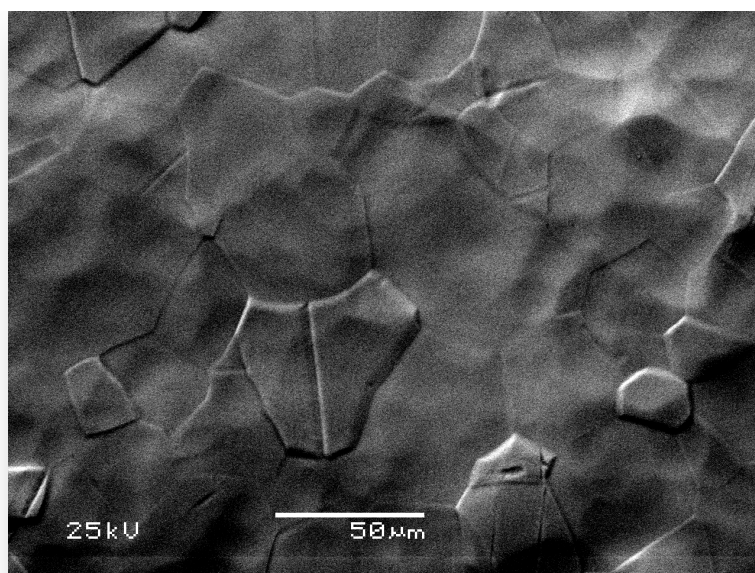


Figura 25A – Imagem de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg (grupo 2). Ampliação 500x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).



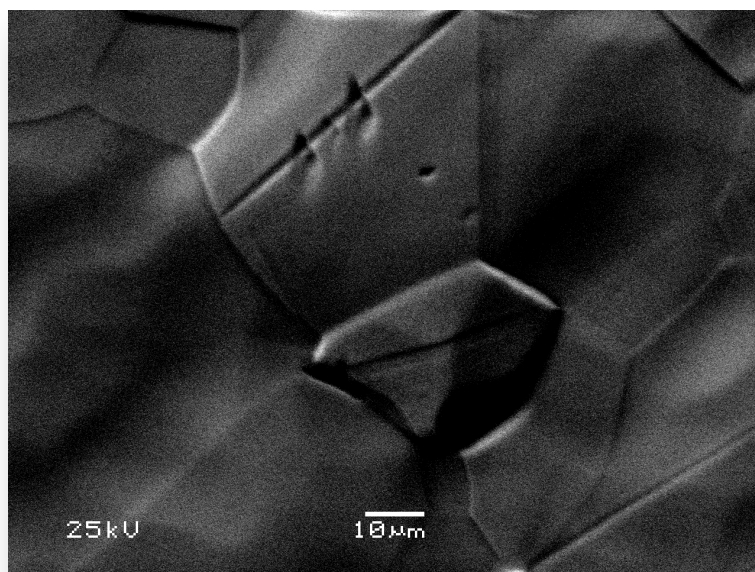


Figura 25B – Imagem de MEV de disco de superfície de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg (grupo 2). Ampliação 1000x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

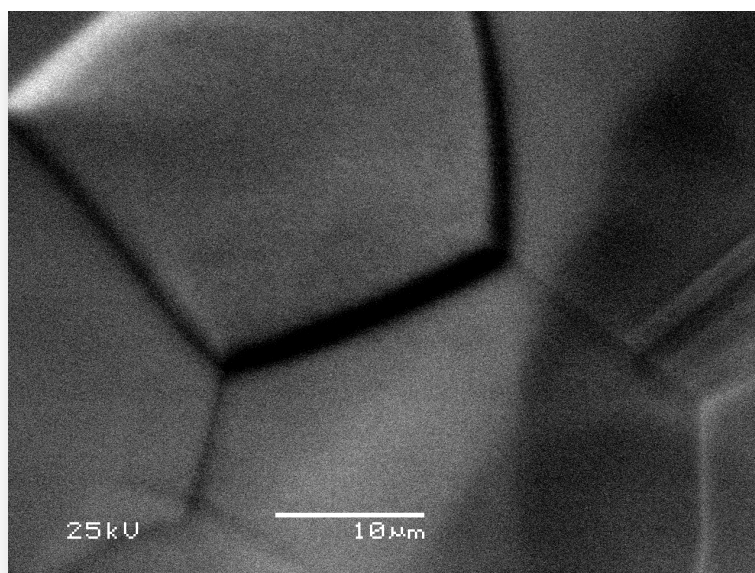


Figura 25C – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg (grupo 2). (Ampliação 2500x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38)

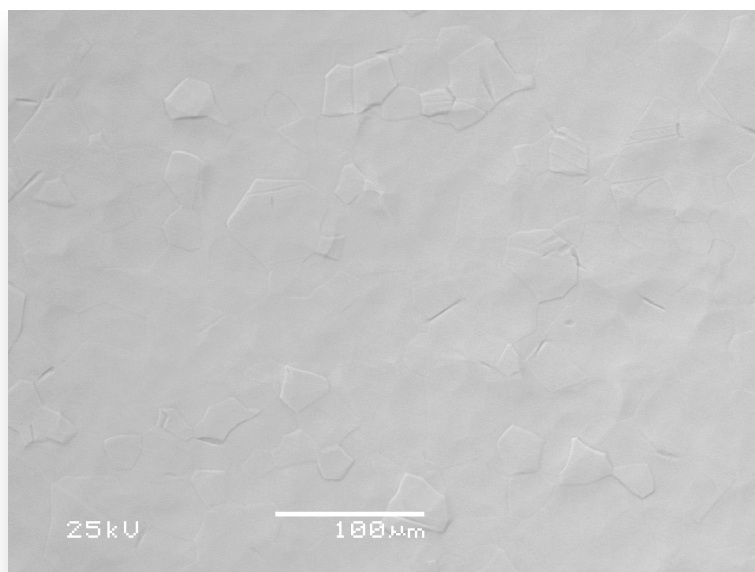


Figura 26A – Imagem de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 60 seg (grupo 3). (Ampliação 250x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

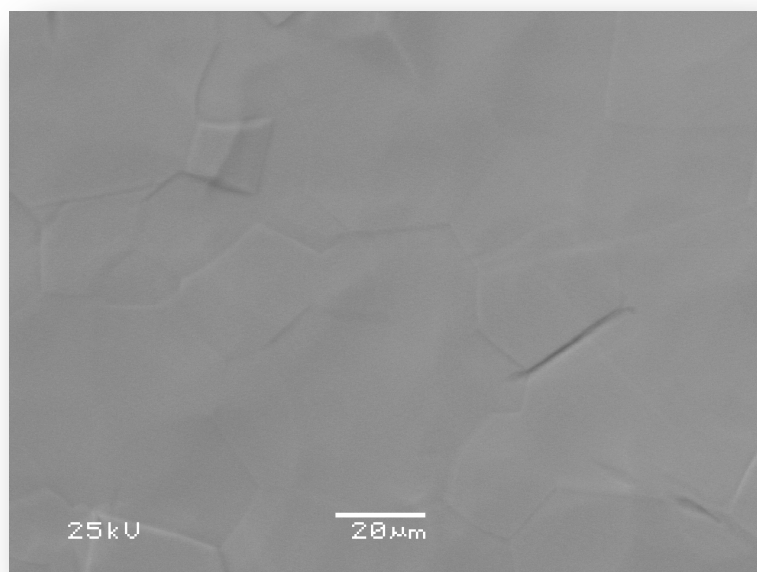


Figura 26B – Imagem de Mev de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 60 seg (grupo 3). (Ampliação 750x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).



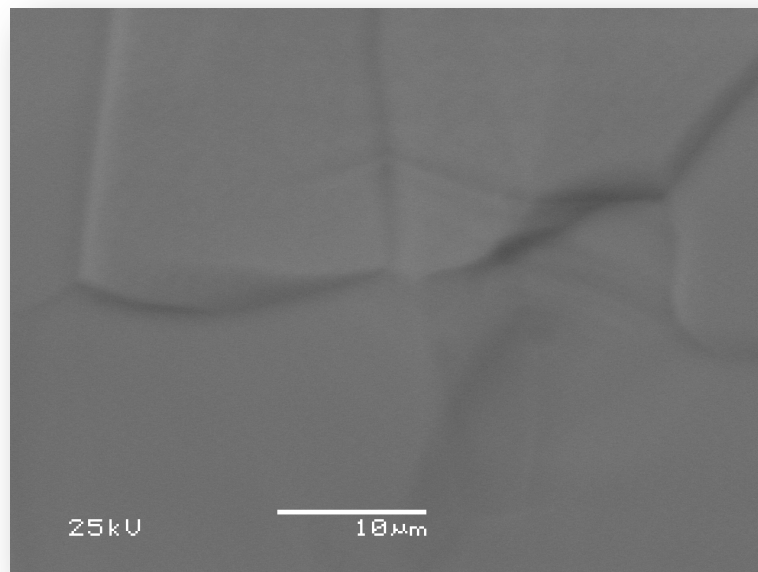


Figura 26C – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 60 seg (grupo 3). (Ampliação 1000x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

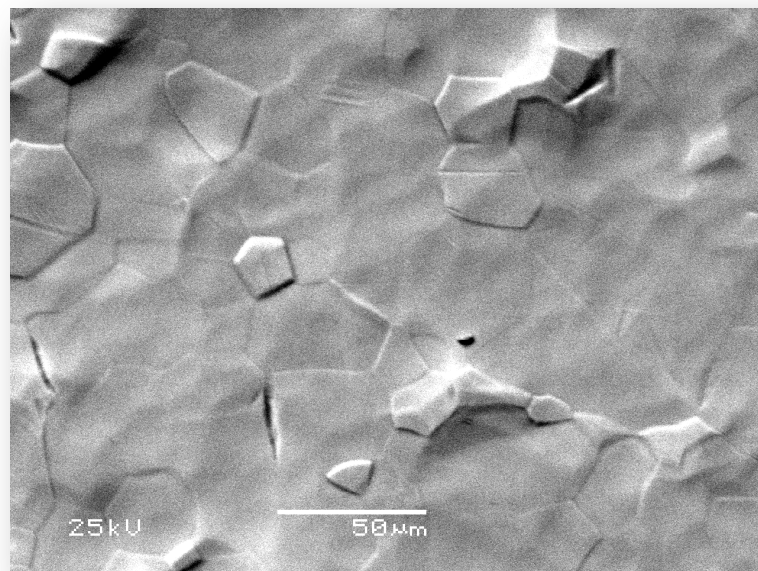


Figura 27A – Imagem de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg e análise topográfica após 7 dias (grupo 4). (Ampliação 500x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

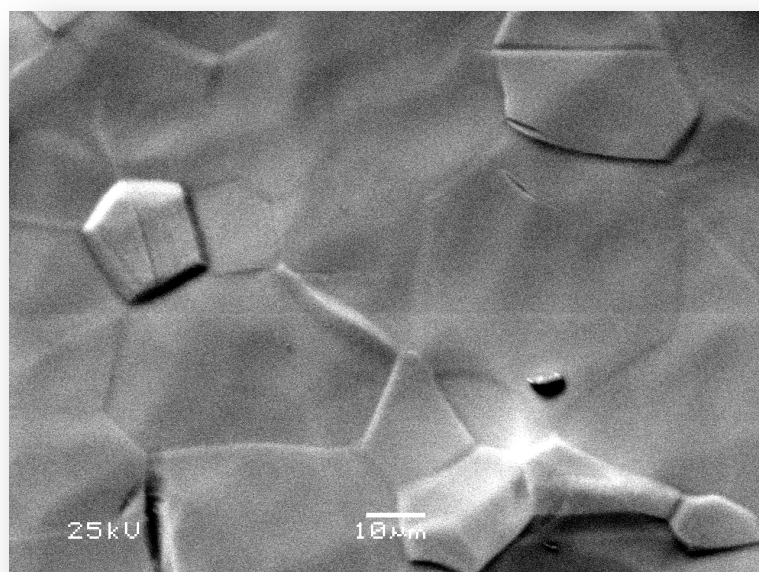


Figura 27B – Imagem de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg e análise topográfica após 7 dias (grupo 4). (Ampliação 1000x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

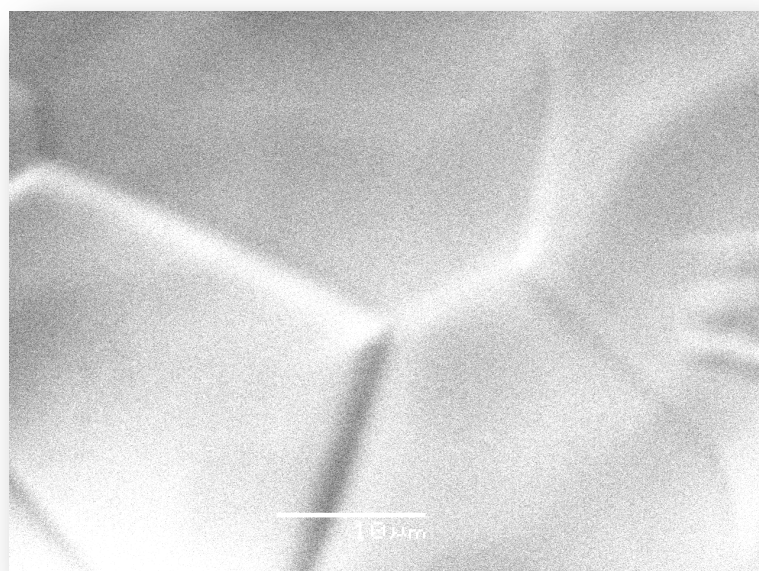


Figura 27C – Imagem de MEV de superfície de disco de Titânio com tratamento de Ozono durante 30 seg e análise topográfica após 7 dias (grupo 4). (Ampliação 2500x; Voltagem 25kv; Spot Size: 38).

## EFEITO DO GÁS OZONO NA CULTURA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Para a avaliação dos efeitos do Ozono sobre culturas bacterianas de *Staphylococcus aureus* foram utilizados os 8 discos de Titânio, da amostra de 20 espécimenes tratadas com ataque ácido, segundo o protocolo descrito no capítulo dos Materiais e Métodos, pelo Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho. Estes discos foram divididos em dois grupos de estudo com o mesmo número de espécimenes em cada um (4): grupo 'A' (controle positivo - sem aplicação do Ozono) e grupo 'B' (com tratamento de Ozono durante 40 seg).

Uma vez terminado o período de incubação dos discos de Titânio, durante as 48 h a 37 °C em Tryptic Soy Broth (Difco®), suplementado com glucose a 1% (Sigma-Aldrich®), obtiveram-se os resultados de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) de *Staphylococcus aureus* para o grupo do controlo positivo e para o grupo de aplicação de 40 seg de Ozono, presentes nas Tabela 4 e Tabela 5. Da observação destas últimas, destacaram-se os valores obtidos de UFC de 2,00E+05 (Tabela 5) com a diluição 1,00E-02 (Tabela 5) no grupo de aplicação de 40 seg de Ozono e os valores obtidos de UFC de 4,05E+07 com a diluição 1,00E-04 (Tabela 4) no grupo de controlos positivos.

**Tabela 4: Contagem das colónias de *Staphylococcus aureus* no grupo de controlos positivos (grupo A).**

<b>Controlo Positivo</b>				
Amostra	Contagem	Diluição	UFC	Log
A1	15	1,00E-05	7,50E+07	7,88
A2	58	1,00E-04	2,90E+07	7,46
A3	53	1,00E-04	2,65E+07	7,42
A4	81	1,00E-04	4,05E+07	7,61
				<b>Média</b>
				7,59
				<b>Desvio Padrão</b>
				0,177226666

Controlo positivo – grupo de discos sem aplicação de Ozono (grupo A); Amostra – Disco de Titânio; Contagem – contagem do número de colónias; Diluição - diluição de contagem; UFC – unidade formadora de colónias, Log – logaritmo de contagem de UFC; Média – média dos logaritmos das UFCs , Desvio Padrão – desvio padrão em relação à média dos logaritmos das UFCs.

**Tabela 5: Contagem das colónias de *Staphylococcus aureus* no grupo tratado com 40 seg de Ozono (grupo B).**

<b>Tratamento 40 seg</b>				
Amostra	Contagem	Diluição	UFC	Log
B1	42	1,00E-02	2,10E+05	5,32
B2	26	1,00E-02	1,30E+05	5,11
B3	25	1,00E-02	1,25E+05	5,10
B4	40	1,00E-02	2,00E+05	5,30
				<b>Média</b>
				5,21
				<b>Desvio Padrão</b>
				0,103546077

*Tratamento 40 seg* – grupo de discos com aplicação de Ozono durante 40 seg (grupo B); *Amostra* – Disco de Titânio; *Contagem* – contagem do número de colónias; *Diluição* - diluição de contagem; *UFC* – unidade formadora de colónias, *Log* – logaritmo de contagem de UFC; *Média* – média dos logaritmos das UFCs , *Desvio Padrão* – desvio padrão em relação à média dos logaritmos das UFCs.

De forma a explicitar mais claramente os resultados obtidos relativamente ao número de unidades formadoras de colónias de *Staphylococcus aureus* nos 2 grupos estudados (grupo A - controlos positivos e grupo B - tratamento com Ozono a 40 seg), resumem-se os respetivos resultados nas tabelas 6 e 7.



**Tabela 6 – Unidades formadoras de colónias versus controlo positivo.**

UFC/ml	log	Tratamento
75000000	7,875061263	<b>Controlo Positivo</b>
29000000	7,462397998	
26500000	7,423245874	
40500000	7,607455023	

UFC/ml – unidade formadora de colónias por mililitro, log – logaritmo da UFC/ml, Tratamento controlo positivo – grupo de discos sem aplicação de Ozono (grupo A).

**Tabela 7 – Unidades formadoras de colónias versus tratamento com Ozono.**

UFC/ml	log	Tratamento
210000	5,322219295	<b>Tratamento com Ozono</b>
130000	5,113943352	
125000	5,096910013	
200000	5,301029996	

UFC/ml – unidade formadora de colónias por mililitro, log – logaritmo da UFC/ml, Tratamento com Ozono – grupo de discos com aplicação de Ozono durante 40 seg (grupo B).

Aplicando a fórmula descrita no capítulo dos materiais e métodos para determinação da percentagem de inibição de crescimento bacteriano, encontraram-se diferentes percentagens de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus*, as quais estão presentes na Tabela 8.

**Tabela 8 – Percentagens de inibição de crescimento de colónias de *Staphylococcus aureus*.**

% Inibição	
	32,41678869
	31,47050916
	31,33852631
	30,31795811
<b>Média</b>	31,38594557
<b>Desvio Padrão</b>	0,85880427

% Inibição – percentagem de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus*, Média – valor médio da percentagem de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus*, Desvio Padrão – desvio padrão em relação à média da percentagem de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus*.

Verificou-se que houve uma inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* de 31,4% no grupo de aplicação do Ozono durante o período de 40 seg (grupo B). O tratamento com Ozono da superfície dos discos de Titânio conduziu a uma redução de cerca de 2,5 ciclos logarítmicos, tal como evidenciado na Tabela 8.

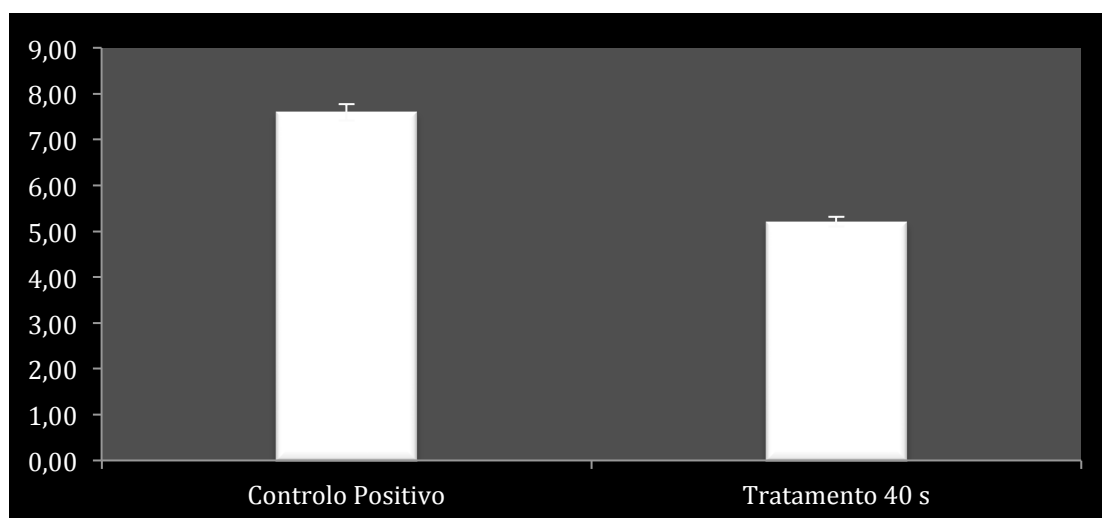


Figura 28 – Contagem de microorganismos viáveis (log UFC/ml) de *Staphylococcus aureus* nos dois grupos de estudo ( grupo A - controlo positivo, sem aplicação do Ozono; grupo B - com tratamento com Ozono durante 40 seg).

O tratamento com Ozono, por 40 seg (grupo B), reduziu a formação de unidades formadoras de colónias nas superfícies dos discos de Titânio utilizados neste estudo. O teste de Mann Whitney, selecionado pelo software Graphpad PRISM, versão 4.0 (GNU, General Public License) indicou uma diferença significativa entre os dois grupos – grupo de controlo positivo (grupo A) e grupo de aplicação de Ozono durante 40 seg (grupo B) – relativamente às unidades formadoras de colónias bacterianas ( $p=0,0286$ ;  $p<0,05$ ), no sentido de que o valor foi significativamente inferior no grupo com a aplicação do Ozono a 40 seg (grupo B).

Após a análise observacional da superfície das amostras de Titânio com as culturas de *Staphylococcus aureus*, efetuada em paralelo, através de microscopia eletrónica de varrimento, destacaram-se os seguintes resultados: no grupo de controlo positivo (grupo A - sem aplicação do Ozono) claramente a imagem de MEV evidenciou



maior população microbiana do que a presente no grupo com aplicação do Ozono durante 40 seg (grupo B) (Figuras 29 e 30).

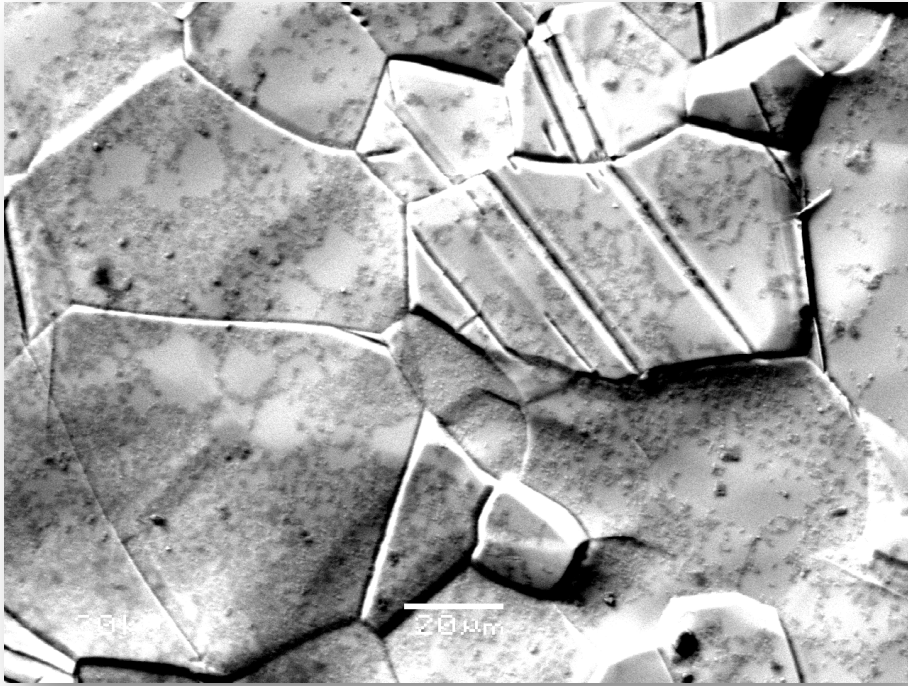


Figura 29: Imagem de MEV da superfície de disco de Titânio com *S.aureus* sem tratamento com Ozono (grupo A). (Ampliação 800x; Voltagem 20 kv e Spot Size 41).

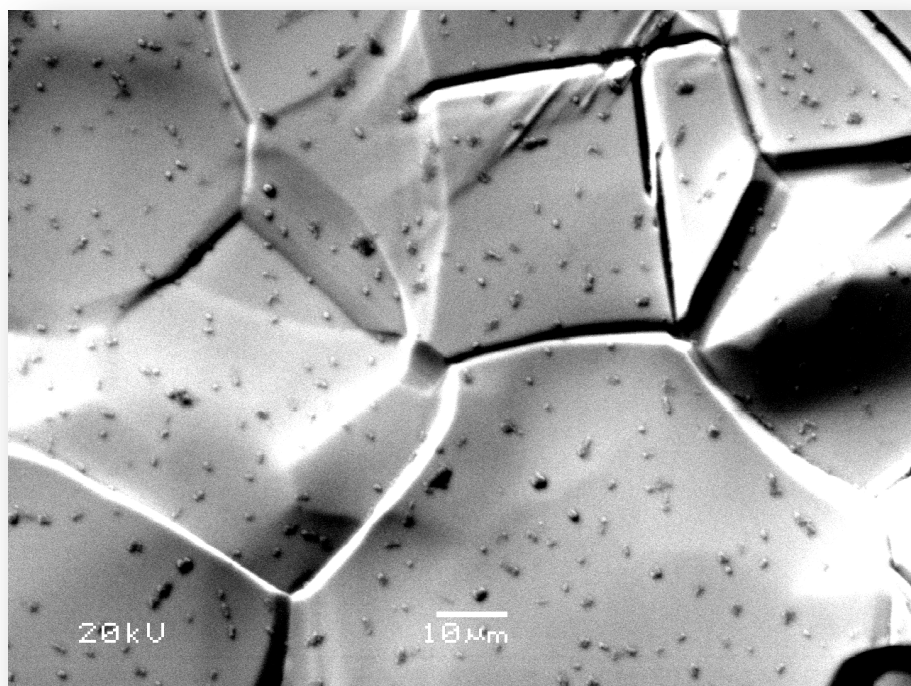


Figura 30: Imagem de MEV da superfície de disco de Titânio com *S. aureus* e tratamento com Ozono durante 40 seg (grupo B). (Ampliação 1000x; Voltagem 20 kv e Spot Size 41).

# DISCUSSÃO

« ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

Grande parte dos casos de insucesso e mesmo de perda dos implantes dentários podem ocorrer por peri-implantite e/ou fracasso da osteointegração (55, 99). Uma vez que a infecção bacteriana tem sido apontada como uma das principais fatores etiológicos associados à peri-implantite (73, 102), provavelmente a redução da colonização bacteriana, bem como a própria eliminação de bactérias das superfícies dos implantes dentários, podem constituir a chave para se evitar a instalação de uma peri-implantite e/ou da sua resolução.

Nesse sentido, o nosso estudo demonstrou que o Ozono gasoso possui uma eficácia no controlo das bactérias aderentes a uma superfície de implantes desenvolvida por ataque ácido [ $\text{HNO}_3$ , HF e  $\text{H}_2\text{O}$  em proporções iguais (1:1:1)], *in vitro*, sem provocar qualquer dano na topografia superficial do Titânio (Figuras 24A, 24B, 24C, 25A, 25B, 25C, 26A, 26B, 26C, 27A, 27B, 27C). O que está de acordo com um dos poucos estudos existentes com similaridades aos presentes no nosso (35).

A adesão das bactérias sobre os implantes de Titânio já foi sobejamente descrita e fundamentada, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os principais fatores que influenciavam essa adesão bacteriana eram a energia livre da superfície, a composição química e, em particular, a rugosidade da superfície do material do implante (120-123). Em diferentes ensaios, pela visualização das imagens de MEV, observou-se que as superfícies rugosas de implantes promoviam uma adesão bacteriana superior em comparação com as superfícies lisas (68). Sendo a superfície utilizada na nossa investigação, uma superfície obtida por um ataque ácido, que promove uma aparência característica em observações de superfície por MEV, com cavidades sobrepostas com micro poços (Figuras 24A, 24B, 24C, 25A, 25B, 25C,

26A, 26B, 26C, 27A, 27B, 27C), portanto, com rugosidade, os nossos resultados estão em concordância com o fato da adesão bacteriana ocorrer mais facilmente em superfícies rugosas. Na nossa investigação também se verificou que a adesão bacteriana do *S.aureus* foi obtida em todos os discos inoculados.

No entanto, não podemos deixar de salientar que a microflora oral é variável, de acordo com diversos fatores a que a cavidade oral está exposta. Entre vários salientaram-se a dieta, a ação da saliva, do fluido gengival, da concentração de Oxigénio e de outros fatores, dos quais se destacam as doenças sistêmicas, a utilização de diversos antibióticos, medidas de higiene geral e oral e o próprio genoma do indivíduo (55).

Alguns estudos revelaram que o Ozono gasoso foi capaz de eliminar as bactérias *S.aureus* de superfícies dentárias e reportaram o mesmo efeito significativo do gás Ozono contra diversas bactérias orais (42, 124, 125).

Devemos destacar com humildade, que o fato do Ozono se ter mostrado eficaz na nossa investigação contra o *S.aureus*, não significa que a sua eficácia seja semelhante contra a diversidade da microbiota oral e sobretudo contra a microbiota característica da peri-implantite.

Para se promover a eliminação e/ou redução das bactérias presentes nas superfícies de implantes, a nível subgengival, foi sugerido, durante vários anos, o recurso a instrumentos mecânicos (126). Contudo, outros autores defenderam que a aplicação destes instrumentos danificava a estrutura da superfície do implante e promovia a contaminação ou adesão de pó abrasivo na superfície implantar (126).

No nosso estudo *in vitro*, o Ozono gasoso não promoveu alterações na topografia da superfície dos discos (demonstrada pela análise por MEV) e em simultâneo evidenciou uma atividade bacteriostática eficaz. Uma vez que se verificou uma inibição significativa do

crescimento do *Staphylococcus aureus* de 31,4% no grupo dos discos de Titânio onde se efetuou a aplicação do Ozono durante 40 seg. Estes resultados estão em conformidade com os presentes em outros estudos *in vitro*, que demonstraram que o Ozono apresentou um efeito antibacteriano, em bactérias suspensas em água pura. Contudo, nestes estudos similares, o efeito antibacteriano do Ozono revelou-se menos eficaz, quando as células foram incluídas num biofilme ou em material orgânico (44, 47).

A eficácia reduzida por parte do Ozono gasoso, na ação sobre as lesões de cárie dentária, foi descrita por dois estudos *in vivo*, com recurso ao mesmo equipamento (HealOzone®) (127, 128). Estes autores sugeririam que as interações com o material orgânico reduzem a atividade antimicrobiana de gás Ozono *in vivo* (127, 128). Este, de fato, poderá constituir um problema comum da aplicação do Ozono gasoso na cavidade oral, ou seja, a presença de material orgânico poderá impedir a realização de desinfecção rápida e eficaz de superfícies colonizadas por bactérias, nomeadamente de dentes e implantes. Outros investigadores, porém, revelaram eficácia do Ozono gasoso na eliminação do *S.aureus* de superfícies dentárias e descreveram um efeito similar do Ozono contra outras bactérias orais (42, 125).

Já um outro estudo, de Irmgard et al., 2011, demonstrou que a aplicação de Ozono gasoso, durante um período de tempo de 24 seg em células de *S. sanguinis*, aderido à superfície de Zircónia promoveu a morte de cerca de 91% das referidas bactérias (35).

Perante esta controvérsia, acreditamos que a eliminação bacteriana pelo Ozono poderá estar muito dependente da presença do referido material orgânico mas também da manutenção do vácuo sobre as superfícies de aplicação do Ozono. São emergentes mais estudos *in vivo* para determinação da eficácia do Ozono na eliminação de outras bactérias orais, tendo em consideração as variáveis material

orgânico, os tempos de aplicação do Ozono e os dispositivos que geram o vácuo.

Pode ser hipotetizado que, um período de aplicação de Ozono gasoso superior ou a aplicação de uma dose mais elevada de Ozono, poderiam ter potenciado o efeito do Ozono sobre *S. aureus* aderido às superfícies dos discos de Titânio utilizados na nossa investigação. O tempo de aplicação do Ozono gasoso, por nós aplicado, foi de acordo com as instruções do fabricante (HealOzone®).

No entanto, em relação a toxicidade potencial de Ozono, realçamos que não se deva alcançar uma concentração acima dos níveis permitidos, tanto no trato respiratório dos pacientes como no ar circundante do médico dentista. Na realidade, várias diretrizes recomendaram limites de segurança de 0,1 ppm de Ozono no ar, para uma exposição contínua de 8 h (16). Realçamos também o fato de, até à data, não se encontrar disponível nenhum equipamento de administração de Ozono gasoso, que permita a aplicação do gás na bolsa periodontal, sem inalação de gás por parte do paciente.

Um tempo de aplicação mais prolongado do Ozono gasoso, não foi abordado neste estudo, mas não deixa de representar uma área para futuras pesquisas, nas quais é também nossa pertença a comparação dos efeitos das aplicações de Ozono em diferentes superfícies de implantes de Titânio.





## CONCLUSÕES

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

A aplicação do Ozono, com recurso ao equipamento HealOzone®, em discos de Titânio, com uma superfície tratada com um ataque ácido (ácido fluorídrico + ácido nítrico + água na proporção 1:1:1), não resultou em nenhuma alteração na topografia da referida superfície, o que sugere que a aplicação do Ozono não promova nenhuma alteração superficial topográfica, se aplicado em implantes *in vivo*, com a mesma superfície.

A aplicação do Ozono, com recurso ao equipamento HealOzone®, em discos de Titânio, com uma superfície tratada com um ataque ácido (ácido fluorídrico + ácido nítrico + água na proporção 1:1:1), numa superfície revestida com elevado número de *S.aureus* (1x10<sup>8</sup> UFC/ml) conduziu a um efeito bacteriostático.

Ainda que com resultados *in vitro* promissores, a potencial relevância deste equipamento (HealOzone®) e de outros similares, na terapêutica da peri-mucosite e peri-implantite, necessita de mais estudos *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro* é importante a avaliação da eficácia do Ozono contra bactérias associadas à peri-implantite e peri-mucosite e a utilização de outras superfícies de implantes. Nos estudos *in vivo* é emergente testar a eficácia do Ozono no tratamento da patologia peri-implantar, sendo determinantes as investigações com diferentes superfícies de implantes, comercialmente disponíveis, com recurso à identificação das várias bactérias patogénicas peri-implantares por PCR e à caracterização de marcadores inflamatórios e composição iónica do fluido peri-implantar.

# LINHAS DE INVESTIGAÇÃO FUTURAS

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

Como é sabido o Ozono possui um papel crítico na estrutura térmica da estratosfera, bem como quadro ecológico para a vida na superfície da Terra. Pelas suas propriedades, o Ozono, em qualquer das suas fases, aquosa ou gasosos, constitui um desinfetante de grande utilidade, com uma vasta gama de aplicabilidades. Sobretudo, este agente tem-se revelado um potente agente antimicrobiano, fiável e eficaz, contra bactérias, fungos, protozoários e vírus.

Note-se que já durante o período da I Guerra Mundial, o Ozono gasoso foi utilizado no tratamento de várias lesões presentes em soldados, das quais se destacam: a gangrena gasosa pós-traumática, as feridas infetadas, as queimaduras e fístulas. A terapia com Ozono foi aceite como terapêutica alternativa em medicina nos EUA já em 1880, sendo amplamente utilizada até ao período de 1932. Hodiernamente, a terapia com Ozono é uma opção de tratamento na área médica reconhecida em 16 Países a nível Mundial. Contudo, especificamente em medicina dentária, ainda se encontra numa fase muito embrionária, onde a maioria dos estudos existentes são apenas *in vitro*, tornando-se, por isso, emergente a necessidade de realização de mais estudos para avaliação dos efeitos do Ozono e suas aplicabilidades, que sejam sobretudo ensaios clínicos, principalmente *in vivo*.

Na realidade, os resultados desta e de outras investigações *in vitro*, embora se tenham revelado positivos, urge a necessidade de promoção de ensaios onde se analisem os efeitos do Ozono na cavidade oral. A peri-implantite ainda é uma patologia de difícil resolução e cujo número de casos tem tido um incremento. De fato o alargamento do conhecimento, sobre toda e qualquer arma

disponível para o tratamento da peri-implantite, constitui uma mais valia nos dias de hoje na medicina dentária e *quiçá* a instituição de terapêuticas com o Ozono poderiam vir a constituir mais um pequeno passo no auxílio da resolução desta patologia.



## RESUMO

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

O Ozono é considerado um dos mais potentes agentes antimicrobianos, disponíveis para aplicação em medicina e medicina dentária. A aplicação do Ozono como terapia está atualmente instituída e difundida, tanto em medicina como em medicina dentária, como uma alternativa às terapias antimicrobianas convencionais e como terapêutica coadjuvante na maioria dos Países Europeus. A aplicação do Ozono em medicina dentária tem sido descrita e proposta em diversas áreas, nomeadamente em dentisteria operatória, em endodontia, em medicina oral e também em cirurgia oral.

A utilização de implantes dentários pela comunidade de médicos dentistas tem vindo a assumir uma importância cada vez maior, dada a evolução, diversidade e disponibilidade dos sistemas de implantares na atualidade.

A microbiota que se forma sobre superfícies de implantes dentários pode ser altamente resistente a agentes antimicrobianos e pode mesmo causar infeções de difícil resolução, tais como alguns casos de periodontite ou peri-implantite. A peri-implantite é considerada uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro às bactérias, associada à perda do suporte ósseo do implante.

O objetivo geral desta dissertação foi estudar o impacto da aplicação do Ozono numa superfície de implantes, com o equipamento HealOzone®, como forma de avaliar o potencial futuro do Ozono no terapêutica da doença peri-implantar.

A amostra deste estudo foi composta por um total de 20 discos de Titânio com uma superfície tratada quimicamente com ataque ácido. Após finalização da preparação, as amostras foram todas codificadas e através de um algoritmo de seleção aleatória, distribuídas em 2 grupos: um grupo com 12 discos e outro grupo com 8 discos. No grupo



de 12 discos foi efetuada a análise do efeito da aplicação do Ozono nas superfícies dos discos de Titânio, através de microscopia eletrônica de varrimento (MEV). No grupo com 8 discos foi realizado um estudo comparativo do efeito da aplicação do Ozono na inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* nos discos de Titânio. Paralelamente, nos mesmos 8 discos de Titânio com cultura de *S. aureus*, foi feita a análise da superfície, com recurso à MEV. Os 12 discos foram divididos em 4 grupos de 3 amostras: grupo 1- sem qualquer tratamento com Ozono, grupo 2 - com aplicação de 30 segundos (seg) de Ozono e análise imediata por MEV, grupo 3 - com aplicação de 60 seg de Ozono e análise imediata por MEV, grupo 4 - com aplicação de 30 seg de Ozono, armazenamento durante 7 dias seguido de análise por MEV.

As outras 8 amostras foram inoculadas com *S. aureus*, e separadas em 2 grupos, de 4 discos cada: grupo A - sem aplicação de Ozono, grupo B - tratadas com Ozono.

No grupo dos 12 discos, os resultados da análise observacional da MEV demonstraram uma microestrutura característica das superfícies de Titânio, com cavidades sobrepostas com micropoços, devido ao tratamento de condicionamento ácido, portanto sem diferenças entre os 4 grupos. No grupo dos 8 discos verificou-se uma inibição de crescimento do *S. aureus* de 31,4% após a aplicação do Ozono. O tratamento da superfície dos discos de Titânio com Ozono conduziu a uma redução de cerca de 2.5 ciclos logarítmicos.

O estudo da superfície dos mesmos 8 discos revelou uma redução evidente do *S. aureus* nos discos de Titânio, em particular no grupo de aplicação de 40 seg do Ozono e a ausência de alterações na topografia da superfície.

Concluiu-se que a aplicação do Ozono em discos de Titânio não condicionou nenhuma alteração da superfície dos discos e que a aplicação do Ozono em discos de Titânio conduziu a um efeito

bacteriostático, demonstrando-se assim a potencial relevância deste equipamento na terapêutica da peri-implantite.

## ABSTRACT

« ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

Ozone is considered one of the most potent antimicrobial agents available for use in medicine and dentistry. The application of Ozone as therapy is currently established and widespread, both in medicine and in dentistry as an alternative to conventional antimicrobial therapy and as complementary therapy in most European countries. The application of ozone in dentistry has been described and proposed in several areas, particularly in operative dentistry, endodontics, oral medicine and oral surgery also.

The application of ozone in dentistry has been described and proposed in several areas, particularly in operative dentistry, endodontics, oral medicine and oral surgery also.

The microbiota that forms on surfaces of dental implants can be highly resistant to antimicrobial agents and may even cause infections difficult to solve, such as some cases of periodontitis or peri-implantitis. The peri-implantitis is considered an exacerbated inflammatory response of the host to the bacteria associated with the loss of bone support of the implant.

The general aim of this thesis was to study the application of ozone on the implant surface with the equipment HealOzone® as a way to assess the future potential of ozone in the treatment of peri-implant disease.

The sample studied comprised a total of 20 disks with a titanium surface treated with chemical acid attack. After completion of the preparation, all samples were coded and through a selection algorithm randomly distributed into 2 groups: one group with 12 disks and the other group with eight disks. In the group of 12 disks, the analysis of the effect of application of ozone on the surface of titanium disks, using scanning electron microscopy (SEM) was performed. In parallel, in the same 8 titanium disks with *S. aureus*, the analysis of the surface using the SEM was performed. The 12 disks were divided into 4

groups of three samples: Group 1 - group without any treatment with ozone and analysis by SEM, 2 - group with application of ozone for 30 seconds (sec) and immediate analysis by SEM, 3 - group with application of ozone for 60 sec and immediate analysis by SEM, 4 – group with application of 30 sec Ozone, storage for 7 days and followed by SEM analysis..

The other 8 samples were inoculated with *S. aureus*, and separated into 2 groups of 4 discs each: group A - without application of Ozone Group B - treated with ozone.

In the group of 12 discs, the results of observational analysis by SEM showed a microstructure characteristic of the titanium surface showing overlapping cavities with microwells due to the acid conditioning treatment, so no differences among the 4 groups were observed. In the group of 8 disks there was an inhibition of growth of *S. aureus* of 31.4% after application of ozone. The surface treatment of the titanium disks with ozone led to a reduction of about 2.5 log cycles.

The study of the surface of these 8 discs showed a clear reduction of *S. aureus present on the* titanium disks, particularly in the group with application of 40 sec of ozone and the absence of changes in surface topography

It was concluded that the application of ozone in conditioned titanium discs does not change any surface of disks and that the application of ozone on titanium discs led to a bacteriostatic effect, thus demonstrating the potential relevance of this device in treatment of peri-implantitis.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

« ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO OZONO NAS SUPERFÍCIES  
IMPLANTARES »

1. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res 2006;37(4):425-35.
2. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. J Contemp Dent Pract 2008;9(4):75-84.
3. Sawadaishi K, Miura K, Ohtsuka E, Ueda T, Ishizaki K, Shinriki N. Ozonolysis of supercoiled pBR322 DNA resulting in strand scission to open circular DNA. Nucleic Acids Res 1985;13(20):7183-94.
4. Mudd JB, Leavitt R, Ongun A, McManus TT. Reaction of ozone with amino acids and proteins. Atmos Environ 1969;3(6):669-82.
5. Young SB, Setlow P. Mechanisms of killing of Bacillus subtilis spores by Decon and Oxone, two general decontaminants for biological agents. J Appl Microbiol 2004;96(2):289-301.
6. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. Appl Environ Microbiol 1981;41(3):718-23.
7. Katzenelson E, Koerner G, Biedermann N, Peleg M, Shuval HI. Measurement of the inactivation kinetics of poliovirus by ozone in a fast-flow mixer. Appl Environ Microbiol 1979;37(4):715-8.
8. GR. B, TM. M, M. P. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. Appl Microbiol 1975;29(3):340-4.
9. JB. M, PJ. D, J. S. Ozone does not react with human erythrocyte membrane lipids. Arch Biochem Biophys 1997;341(2):251-8.
10. Bocci VA. The case for oxygen-ozone therapy. Br J Biomed Sci 2007;64:44-9.
11. Arsalane K, Gosset P, Vanhee D, Voisin C, Hamid Q, Tonnel AB, et al. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;13(1):60-8.
12. van Hoof HJ, Zijlstra FJ, Voss HP, Garrelds IM, Dormans JA, van Bree L, et al. The effect of ozone exposure on the release of



eicosanoids in guinea-pig BAL fluid in relation to cellular damage and inflammation. *Mediators Inflamm* 1997;6(5-6):355-61.

13. Bayram H, Sapsford RJ, Abdelaziz MM, Khair OA. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of proinflammatory mediators from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(2):287-94.

14. Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR. Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor-alpha receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(3):L537-46.

15. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002;3:1129-34.

16. Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent* 2007;35(3):195-200.

17. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *J Nat Sci Biol Med* 2011;2(2):151-3.

18. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009;4(2):130-42.

19. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci* 1999;56(4):270-9.

20. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 2006;114(5):435-40.

21. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004;30(11):778-81.

22. Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol* 2002;18(5):262-6.

23. Noguchi F, Kitamura C, Nagayoshi M, Chen KK, Terashita M, Nishihara T. Ozonated water improves lipopolysaccharide-induced responses of an odontoblast-like cell line. *J Endod* 2009;35(5):668-72.
24. Bassi P, Sbrascini S, Mattassi R, D'Angelo F, Franchina A. [Ozone in the treatment of herpes zoster]. *Riv Neurobiol* 1982;28(3-4):328-33.
25. Olwin JH, Ratajczak HV, House RV. Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. *J Altern Complement Med* 1997;3(2):155-8.
26. Grootveld M, Silwood CJ, Lynch E. High resolution <sup>1</sup>H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by ozone: relevance to the therapeutic applications of this agent in clinical dentistry. *Biofactors* 2006;27(1-4):5-18.
27. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Silvestri S. Studies on the biological effects of ozone: 6. Production of transforming growth factor 1 by human blood after ozone treatment. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994;8(4):108-12.
28. Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SM, Gallucci C, et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg* 2006;17(6):1080-3.
29. Agrillo A, Sassano P, Rinna C, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg* 2007;18(5):1068-70.
30. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg* 2007;18(5):1071-5.
31. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Foa R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica* 2007;92(9):1289-90.
32. Krozer A, Hall J, Ericsson I. Chemical treatment of machined titanium surfaces. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(3):204-11.

33. Cinquemani C. Human pathogens, nosocomial infections, heat-sensitive textile implants, and an innovative approach to deal with them. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38(1):29-37.
34. Harmankaya N, Igawa K, Stenlund P, Palmquist A, Tengvall P. Healing of complement activating Ti implants compared with non-activating Ti in rat tibia. *Acta Biomater* 2012;8(9):3532-40.
35. Hauser-Gerspach I, Vadaszan J, Deronjic I, Gass C, Meyer J, Dard M, et al. Influence of gaseous ozone in peri-implantitis: bactericidal efficacy and cellular response. An in vitro study using titanium and zirconia. *Clin Oral Investig* 2012;16(4):1049-59.
36. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(4):240-6.
37. Estrela C, Estrela CR, Decurcio Dde A, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Braz Dent J* 2006;17(2):134-8.
38. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *J Appl Microbiol* 2001;90(2):279-84.
39. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, et al. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res* 2007;86(5):451-6.
40. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(4):206-10.
41. Oizumi M, Suzuki T, Uchida M, Furuya J, Okamoto Y. In vitro testing of a denture cleaning method using ozone. *J Med Dent Sci* 1998;45(2):135-9.
42. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic

- microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 2009;42(1):3-13.
43. Velano HE, do Nascimento LC, de Barros LM, Panzeri H. [In vitro assessment of antibacterial activity of ozonized water against *Staphylococcus aureus*]. *Pesqui Odontol Bras* 2001;15(1):18-22.
44. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38(1):22-9.
45. Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(3):e85-91.
46. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007;40(2):85-93.
47. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci* 2007;115(1):77-80.
48. Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *Am J Dent* 2005;18(4):223-8.
49. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res* 2000;34(6):498-501.
50. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim Dent Care* 2005;12(2):47-52.
51. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care* 2006;13(1):37-41.

52. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006;114(4):349-53.
53. Rickard GD, Richardson R, Johnson T, McColl D, Hooper L. Ozone therapy for the treatment of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(3):CD004153.
54. Brazzelli M, McKenzie L, Fielding S, Fraser C, Clarkson J, Kilonzo M, et al. Systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of HealOzone for the treatment of occlusal pit/fissure caries and root caries. *Health Technol Assess* 2006;10(16):iii-iv, ix-80.
55. Vaz P, Gallas MM, Braga AC, Sampaio-Fernandes JC, Felino A, Tavares P. IL1 gene polymorphisms and unsuccessful dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(12):1404-13.
56. Fernandes PCSV. Estudo da Susceptibilidade individual para a resposta inflamatória do hospedeiro em pacientes portadores de prótese dentária implanto-suportada, 2010 (Tese de Doutorado, FMDUP); 2010.
57. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Jr., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29(3):389-401.
58. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19(23):2219-32.
59. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, et al. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999;64(6):499-507.
60. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation

behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 1999;13:38-48.

61. Gomes PS, Botelho C, Lopes MA, Santos JD, Fernandes MH. Evaluation of human osteoblastic cell response to plasma-sprayed silicon-substituted hydroxyapatite coatings over titanium substrates. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94(2):337-46.

62. Miron RJ, Oates CJ, Molenberg A, Dard M, Hamilton DW. The effect of enamel matrix proteins on the spreading, proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces. *Biomaterials* 2010;31(3):449-60.

63. Somayaji SN, Huet YM, Gruber HE, Hudson MC. UV-killed *Staphylococcus aureus* enhances adhesion and differentiation of osteoblasts on bone-associated biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2010;95(2):574-9.

64. Daguno JK, Strecker K, Ziemath EC, Rogero SO, Fernandes MH, Santos C. Effect of partial crystallization on the mechanical properties and cytotoxicity of bioactive glass from the  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$  system. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012;14:78-88.

65. Hao Y, Li S, Han X, Hao Y, Ai H. Effects of the surface characteristics of nanoporous titanium oxide films on Ti-24Nb-4Zr-8Sn alloy on the initial adhesion of osteoblast-like MG-63 cells. *Exp Ther Med* 2013;6(1):241-47.

66. Lin HY, Chen JH. Osteoblast differentiation and phenotype expressions on chitosan-coated Ti-6Al-4V. *Carbohydr Polym* 2013;97(2):618-26.

67. Harvey AG, Hill EW, Bayat A. Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert Rev Med Devices* 2013;10(2):257-67.

68. Yeo IS, Kim HY, Lim KS, Han JS. Implant surface factors and bacterial adhesion: a review of the literature. *Int J Artif Organs* 2012;35(10):762-72.

69. Pina-Vaz I, Barros J, Noites R, Villa-Vigil A, Pintado M, Carvalho MF. Estratégias anti-microbianas na prevenção e tratamento da infecção oral. *Revista Europea de Odonto-Estomatologia* 2011.
70. Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaría FK, Pintado MM. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe* 2012;18(3):305-9.
71. Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A novel direct contact method for the assessment of the antimicrobial activity of dental cements. *J Microbiol Methods* 2013;93(3):168-72.
72. Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe* 2013;20:27-31.
73. Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, Lemmer J. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: bacterial infection. *SADJ* 2012;67(2):70, 72-4.
74. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3(2):81-100.
75. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.
76. Zarb GA, Schmitt A. Implant prosthodontic treatment options for the edentulous patient. *J Oral Rehabil* 1995;22(8):661-71.
77. Cooper LF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *J Prosthet Dent* 1998;80(4):439-49.
78. Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(1):17-29.

79. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88(2):544-57.
80. Cesar Neto JB, Rosa EF, Pannuti CM, Romito GA. Smoking and periodontal tissues: a review. *Braz Oral Res* 2012;26 Suppl 1:25-31.
81. Gómez de Ferraris M MA. *Histología y embriología bucodental*: Editorial Médica Panamericana; 1999.
82. Lindhe J KT, Lang N. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Munksgaard Intl Pub; 1997.
83. Cirelli JA, Park CH, MacKool K, Taba M, Jr., Lustig KH, Burstein H, et al. AAV2/1-TNFR:Fc gene delivery prevents periodontal disease progression. *Gene Ther* 2009;16(3):426-36.
84. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent* 2000;79(6):31-5.
85. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005;49(3):491-516, v.
86. Westfelt E, Rylander H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;25(7):536-41.
87. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2012;5 Suppl:S21-41.
88. Murray CM, Knight ET, Russell AA, Tawse-Smith A, Leichter JW. Peri-implant disease: current understanding and future direction. *N Z Dent J* 2013;109(2):55-62.
89. Wilson V. An insight into peri-implantitis: a systematic literature review. *Prim Dent J* 2013;2(2):69-73.
90. Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. *J Am Dent Assoc* 2002;133(4):452-9; quiz 92-3.



91. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe* 2011;10(4):302-6.
92. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2010;53:167-81.
93. C M. Contemporary Implant Dentistry: Mosby Elsevier; 2008.
94. Araujo ML, N. F. Características dos tecidos periimplantares. *Revista Periodontia* 2008;18(4):8-13.
95. Villas-Boas R. Correlação entre polimorfismo no gene da interleucina-6 e doença peri-implantar. Dissertação De Mestrado 2011.
96. Mansur M. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sulco periimplantar e saliva de pacientes portadores de prótese sobre implantes saudáveis com e sem presença de dentes naturais. Dissertação De Mestrado 2008.
97. Bauman GR, Rapley JW, Hallmon WW, Mills M. The peri-implant sulcus. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(3):273-80.
98. Do Nascimento C, Monesi N, Ito IY, Issa JP, de Albuquerque Junior RF. Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(12):1607-13.
99. Heitz-Mayfield LJ. Diagnosis and management of peri-implant diseases. *Aust Dent J* 2008;53 Suppl 1:S43-8.
100. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):292-304.
101. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1(1):821-78.
102. Lang NP, Mombelli A, Tonetti MS, Bragger U, Hammerle CH. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. *Ann Periodontol* 1997;2(1):343-56.

103. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;14:9-11.
104. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216-48.
105. Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernandez-Barbero JE, Cabrera-Leon A, Sanchez-Fernandez E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(5):579-86.
106. Nibali L, Donos N, Henderson B. Periodontal infectogenomics. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 10):1269-74.
107. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63(4 Suppl):322-31.
108. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
109. Heydenrijk K, Meijer HJ, van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissink A, Stegenga B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(6):829-38.
110. Persson GR, Renvert S. Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013.
111. J Bagg TWM, I R Poxton and A J Smith. *Essentials of Microbiology for Dental Students* 2nd Edition: Oxford University Press; 2006.
112. Aboyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(5):689-96.

113. Graves. D, Cochran. D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74(3):391-401.
114. Schierano G, Pejrone G, Brusco P, Trombetta A, Martinasso G, Preti G, et al. TNF-alpha TGF-beta2 and IL-1beta levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *J Clin Periodontol* 2008;35(6):532-8.
115. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 2011;53(1):8-12.
116. Candel-Marti ME, Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali J, Penarrocha-Diago MA. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(4):e518-21.
117. Huth K, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci* 2011;119(3):204-10.
118. Miles A, Misra S, Irwin J. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene* 1938;38(6):732-49.
119. Kwiatkowska. M, Norman. G, Parker D. PRISM 4.0: Verification of Probabilistic Real-time Systems. *Proc 23rd International Conference on Computer Aided Verification (CAV'11)* 2011;6806:585-91.
120. Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials in vitro. *Dent Mater J* 2007;26(3):361-6.
121. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:68-81.
122. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *J Oral Rehabil* 2004;31(2):140-8.

123. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004;39(4):199-205.
124. Kustarci A, Sumer Z, Altunbas D, Kosum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(5):e73-9.
125. Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence Int* 2008;39(3):231-6.
126. Mouhyi J, Sennerby L, Pireaux JJ, Dourov N, Nammour S, Van Reck J. An XPS and SEM evaluation of six chemical and physical techniques for cleaning of contaminated titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(3):185-94.
127. Hauser-Gerspach I, Pfaffli-Savtchenko V, Dahnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clin Oral Investig* 2009;13(3):287-91.
128. Baysan A, Beighton D. Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. *Caries Res* 2007;41(5):337-41.

